生命科学实验指南系列

现代分子生物学实验原理与技术

陈德富　陈喜文　主编





(Q-1653.0101)

生命科学实验指南系列

- 现代分子生物学实验原理与技术
- 干细胞实验指南
- 上皮细胞培养指南（译）
- 蛋白质电泳实验技术（第二版）
- 现代生物化学与分子生物学仪器与设备
- 精编分子生物学实验指南（第四版，译）
- 生物信息学方法指南（译）
- 动物细胞培养——基本技术指南（第四版，译）
- RNA实验技术手册
- 分子生物学实验室工作汉英图解指南(合作出版)
- 分子克隆实验指南（第三版，译）（上、下册）
- PCR技术实验指南（第二版，影印）
- 蛋白质与蛋白质组学实验指南（影印）
- 蛋白质纯化实验指南——用于蛋白质组学研究（影印）
- 果蝇实验指南（影印）
- 小鼠胚胎操作实验指南（第三版，影印）
- 爪蟾早期发育实验指南（影印）
- 实验室生物安全手册
- 抗体技术实验指南(译)
- 细胞实验指南(译)(上、下册)
- 植物分子生物学实验指南
- 蛋白质结构分析：制备、鉴定与微量测序
- 生态与进化研究中的分子方法
- 神经细胞培养：理论与实践
- 现代微生物学与实验技术



生命科学编辑部
联系电话：010-64012501
http://www.lifescience.com.cn
e-mail：spbio@163.net

ISBN 7-03-016433-4
定 价：40.00 元

销售分类建议： 生物医学/生物科学/分子生物学

生命科学实验指南系列

现代分子生物学实验原理与技术

陈德富　陈喜文　主编

南开大学教材建设资助立项著作

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书图文并茂、格式新颖、通俗易懂，是适应21世纪生命科学发展需要的现代分子生物学实验技术教材和参考书。全书共五篇三十章，包括分子生物学实验基本操作、DNA相关实验、RNA相关实验、基因表达及附录，介绍了广泛使用的现代分子生物学实验技术的基本原理、实验流程和注意事项。原理介绍在先，随后是详细的实验流程，最后是为巩固所学内容提出的思考题。在介绍原理和流程过程中，穿插一些实用的重点提示、试剂作用及可能出现的现象。本书所列流程都是作者研究室正在使用的、在教学中进行过实践的、切实可行的方法，符合国内条件。

本书可作为综合性大学和师范、医学、药学、农学等院校生物类专业本科生和研究生的分子生物学实验教学用书，也可作为生物类相关领域研究人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

现代分子生物学实验原理与技术/陈德富，陈喜文主编.—北京：科学出版社，2006
(生命科学实验指南系列)
ISBN 7-03-016433-4

I. 现… II. ①陈…②陈… III. 分子生物学-实验 IV. Q7-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2005)第130383号

责任编辑：莫结胜 彭克里 席 慧/责任校对：刘小梅
责任印制：钱玉芬/封面设计：耕者设计工作室

科学出版社 出版
北京东黄城根北街16号
邮政编码：100717
http://www.sciencep.com
双青印刷厂 印刷
科学出版社编务公司排版制作
科学出版社发行 各地新华书店经销
*
2006年2月第 一 版 开本：787×1092 1/16
2006年2月第一次印刷 印张：20
印数：1—3 000 字数：452 000

定价：40.00元

(如有印装质量问题，我社负责调换<双青>)

主　　编 陈德富　陈喜文

参加编写人员（以姓氏汉语拼音为序）

陈飞雪　贾向东　马丽娜　钱文成

王绘砖　王维兰　杨　鹏　张宝珠

序

分子生物学是生命科学领域最重要的、发展最为迅速的学科之一，已成为推动生命科学持续发展的主要动力，有力地推动着复杂生命现象的研究与探索。同时，分子生物学中的实验技术对生物制药、生物制品、生物材料以及生物改良等相关产业的发展也产生了巨大的推动力。

教育是科学发展的基础，分子生物学实验技术的重要性决定了21世纪生命科学类青年学子必须掌握这一新兴技术。为适应这一要求，各高等院校先后为本科生和研究生开设了“分子生物学实验”这门课程。南开大学是最早开设“生物化学与分子生物学技术”、“基因操作原理与技术”、“分子生物学实验”等课程的院校之一。1997年又增加了“分子生物学实验”的课时，扩大了授课对象，重新制定了新的课程体系，设置了新的教学内容，编写了与之相适应的新教材。教学实践证明，陈德富教授等结合自身多年教学与科研经验编写的《现代分子生物学实验原理与技术》是成功的，受到了学校的肯定和学生的欢迎，与国内有关书籍相比有许多独特性，尤其是以下两点：

第一，选材恰当。本书分五篇三十章，包括分子生物学基本操作、DNA相关实验、RNA相关实验、基因表达及附录，概括了广泛使用的现代分子生物学实验新技术。

第二，图文并茂。全书使用了近300幅插图，将分子生物学基本原理和技术流程形象地反映出来，使得本书通俗易懂。

该书是南开大学教材建设资助立项著作，相信本书的出版必将推动我国生物学、医学、药学、农学及其他相关学科的发展，必将为生命科学领域各相关专业本科生与研究生的学习提供帮助，该书也可作为相关领域研究人员的参考书。在此，我真诚推荐此书给广大读者。

耿运琪

南开大学副校长、教授

国务院学位委员会学科评议组成员

教育部生物科学与工程教学指导委员会委员

2005年8月3日

前 言

分子生物学是在分子水平上研究生命结构与功能的科学，实验性强，其理论知识需要通过实验才能去验证、巩固与扩充。因此，分子生物学实验技术是一门重要的基础课，是新世纪高素质生物类人才必备技能之一，这一点从国内外各高校将“分子生物学实验”课程列为生物类专业重要基础课这一教学计划可以看出。

分子生物学实验技术的主要特点是：① 涉及面广，随着人类基因组计划的开展与深入，新技术层出不穷；② 实验过程看不见、摸不着；③ 所用仪器种类多、相对昂贵、操作复杂；④ 试剂种类多(大多为有活性的酶试剂)、用量少、价格昂贵。因此，选择重要且实用的、适应新世纪生物类人才培养特点的实验内容；制定一套既与国际接轨，又具特色、培养创新型学生的课程体系是我们高校“分子生物学实验”任课教师应尽的义务之一。同时，编写一本与之配套的实验指导教材也是我们高校有关教师义不容辞的责任。

目前国内外出版了许多以分子生物学技术为唯一内容的参考书，读者群非常大，经典著作隔几年就再版一次，如 *Molecular Cloning* 早已到了第三版，这些巨著主要是针对研究工作者编写的，不适合初学者使用。然而，针对教学编写的分子生物学实验教材很少，有些出版年代已久、技术陈旧，有些则因选材不恰当，也很少被高校选作教学用书。为了紧跟生命科学的发展，适应新时期高教改革的需要，围绕“高素质、宽口径、厚基础”的人才培养目标，提高教学水平和教学质量，我们尝试了一系列教学改革，提出了“分子生物学实验”应包括目的基因克隆和表达、目的蛋白质分离或酶学分析等一系列现代分子生物学实验技术的课程体系。在此课程体系基础上，编写了与之配套的讲义，编写的讲义在南开大学本科生和研究生教学中经过了多年试用，取得了满意的效果。本书即是在原讲义的基础上重新编写而成，新的编写参考了分子生物学实验技术的最新发展，也考虑了研究人员的需要。

全书共分五篇三十章，包括分子生物学基本操作、DNA 相关实验、RNA 相关实验、基因表达及附录。考虑到各层次、各专业学时数的不同，也考虑到初学者预习的需要，每个实验分别阐述其基本原理、实验流程、注意事项和思考题。原理介绍在先，采用图文并茂的方式详细叙述常见分子生物学研究技术的基本原理和操作；随后是详细的实验流程，中间穿插实验中的重点提示、试剂作用或可能出现的现象，初学者依此即可开展工作，并将获得满意结果；最后是为巩固所学内容提出的思考题。

本书所用的实验流程主要来自本研究室所用的方案，而且大多在教学中进行过实践，因此是可行的。本研究室所用实验流程参考了国内外有关著作、期刊论文及产品说明书，并根据需要经过一定的修改。本书在撰写时，使用了大量插图，这些插图或为本书原作，或参考了有关资料。考虑到实验流程和插图来源广泛，也考虑到修改后的流程或插图不完全忠实于原文，因此本书不一一列出文献出处。

本书由陈德富教授、陈喜文副教授主编，贾向东硕士、张宝珠工程师协助编写，陈

飞雪、马丽娜、郭少影、杨鹏、王维兰、王绘砖、钱文成等同志参与了部分章节的编写。耿运琪教授、刘方教授、刁虎欣教授为本书的编写提出过许多有益的建议，耿运琪教授还欣然为本书作序。在教材立项中，白艳玲副教授给予了很大帮助。本书的出版得到了南开大学教材建设项目的资助，得到了科学出版社莫结胜编辑的大力帮助。此一并表示衷心感谢。

在本书撰写过程中，我们力求不出或少出错误，但分子生物学实验技术的发展是迅速的，作者的学识和经验是有限的，加之科研工作繁重和时间紧迫，本书的疏漏和错误之处在所难免，恳请同行专家和读者批评指正。

陈德富　陈喜文

南开大学分子遗传学研究室

2005 年 7 月 8 日

目　录

第三篇　RNA 篇

第四篇　表　达　篇

第五篇　附　　录

第一篇　基本操作篇

确定实验目的和实验材料

↓

确定实验方案

↓

- 确定实验材料和试剂是否符合要求
- 确定实验材料和仪器是否可用
- 制定实验进度表

↓

在记录本上记录实验流程

↓

进行预实验以确定实验流程是否可行

↓

开展正式实验

第一章 绪 论

第一节 基因操作技术

1. 基因操作技术

基因操作技术是在DNA水平上阐明生命现象的技术，又叫重组DNA技术、基因工程，包括DNA的“切”、“连”、“扩”等(图1-1)。“切”指用限制性内切核酸酶切割DNA，“连”指用DNA连接酶连接两个DNA片段，“扩”是指目的DNA在宿主/载体系统中进行扩增。

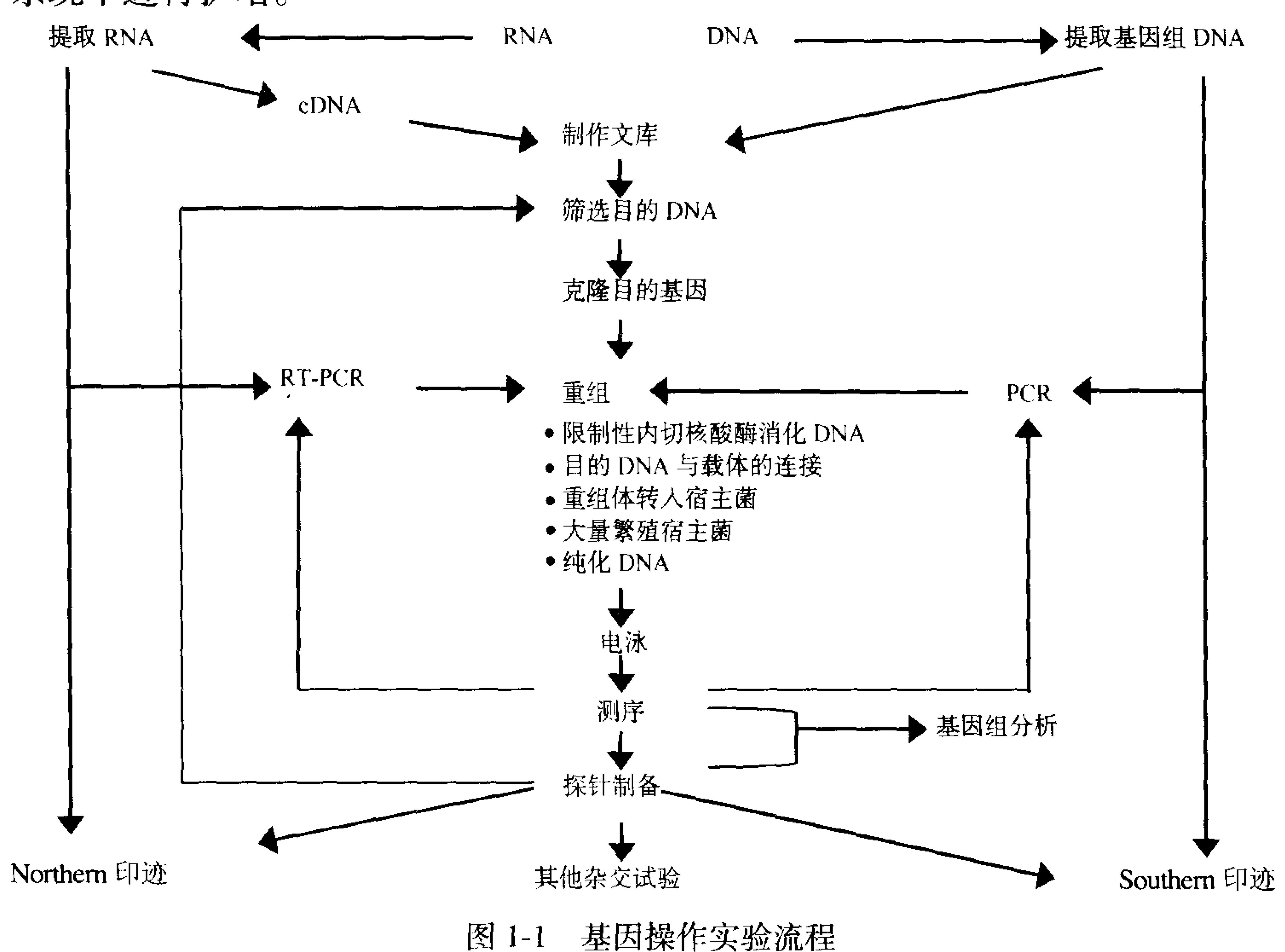


图1-1 基因操作实验流程

2. 实验方案

基因操作实验的主要目的有3个：①分离目的基因，获取DNA信息；②分析基因结构；③分析基因功能。为达到这些目的，实验人员每天在实验室进行着许多不同的实验，然后根据实验结果进行总结，得出一个结论后本实验即告结束。由于实验目的的不同，对于类似的反应(如酶切反应)，也应设计不同的实验流程。首先，应确定使用怎样的研究方案；其次，根据实验规模和研究室情况，应确定怎样的实验流程；最后，根据研究人员的生活规律确定实验时间。这些基本方案在实验过程中可能会出现意想不到的

问题，因此有重新修改的可能。

3. 实验方法

有许多实验方案可完成设计的实验时，如何选择最合适的？应考虑以下几点(图1-2)：①能否达到实验目的；②是否符合实验室的现状；③是否符合自己的喜好。

基因操作实验中使用的酶、同位素等试剂比较昂贵，若有性能相当的廉价商品，首先应选择廉价的商品，当然也可根据实验目的和经费状况考虑使用试剂盒，试剂盒在保证实验准确性方面有独特的优越性。

有些实验非常费时，如何安排时间就显得非常重要。在确定自己能用于实验的时间的基础上，也应在实验流程中注明可以暂停的步骤。例如，限制性内切核酸酶消化的DNA可以保存在乙醇中，也可以干燥保存。本书中的“过夜反应”步骤用“O/N”(over night)标记。

本书列举的实验仪器、设备和材料等有可能与你的情况不完全符合，或本书列举了多个实验方案，你可以根据自己的具体情况或个人爱好做适当选择或修改，这也是在你确定具体实验方案时应予以注意的。

在确定详细实验计划后，还必须进行预实验，以确定实验材料、试剂、仪器、时间等是否符合你的设计。当一切就绪后，即可开展正式实验。

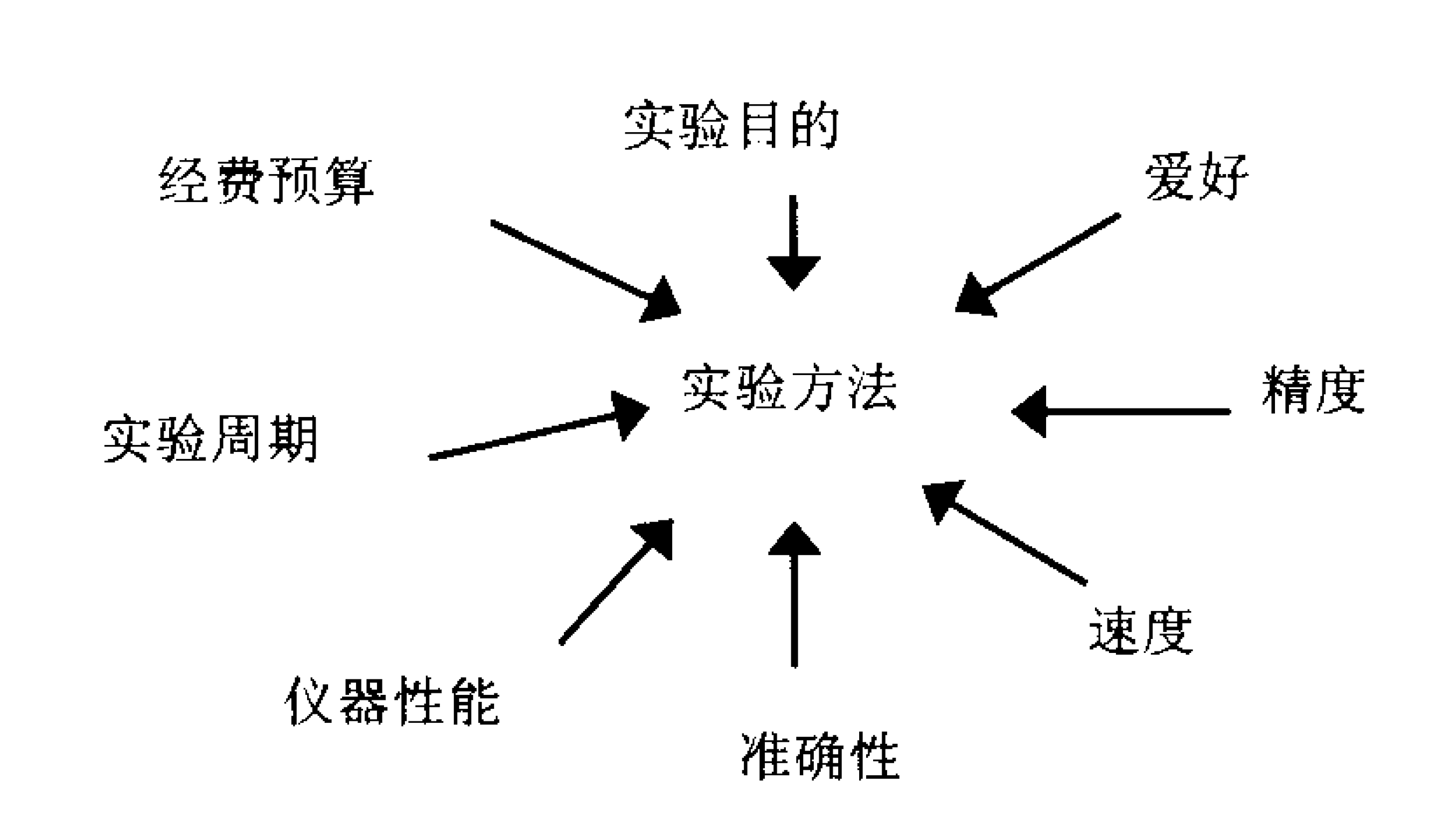


图1-2　确定实验方法时应考虑的因素

4. 如何成为实验高手

有些人每天工作很忙，但实验总是失败，怎么也得不到漂亮的结果。如何成为高手？概括起来，应注意以下几点：①忠于实验流程；②关注实验要点；③准备充足的实验材料；④设平行对照实验；⑤准确的试剂用量；⑥数据整理。

(1) 第一次实验成功，但第二次实验马虎。第一次实验时，严格按照实验流程开展实验，但接下来总认为“我知道了”，“我会了”，而马虎行事，不再严格按实验流程进行实验，甚至更改实验流程，这些往往是实验失败的主要原因。标准的实验流程是经过许多实验者探索出来的，没有充足的理由，尽量不要更改。

(2) 实验精度。实验精度有4个层次：①必须严格按实验流程进行的操作；②较严格的操作流程、允许5%的变动；③允许20%变动的实验操作；④不需要特别注意的实验操作。在一系列实验过程中，要求按第2层次操作的实验流程只能按其规程开展实验(若按第1标准则更好)，不能放宽到第3层次，更不能放宽到第4层次。

(3) 酶促反应不顺利时，若加入更多的酶或DNA，结果会愈来愈糟糕。这时有必要考虑实验材料或试剂中是否混入了反应抑制剂。商品酶或试剂中的稳定剂(如酶液中的甘油、TE中的EDTA等)是酶促反应的抑制剂，应尽量减少它们的用量。

(4) 不设平行对照往往是实验失败的原因。在实验开始时，应有实验失败的忧虑。设平行对照可以发现实验失败的原因，如果实验准备得充足，马上就有保存的材料或试

剂进行第二次实验。

(5) 样品标记的零乱也往往是实验失败的重要原因。添加有样品或试剂的试管或其他器皿应工整地标明其内含物种类、日期等重要信息，而且这些信息应与实验记录本一致，这样，一段时间后能方便地找到你需要的样品。若标记零乱，错拿其他样品进行实验，肯定会失败。

5. 实验材料的准备

1) 购买

培养基、酶、DNA 及相关试剂盒等可方便地从商家那里购买到。对于昂贵的商品应慎重地了解情况后再决定购买。在购买试剂时，若发现与商品目录不符的产品应及时告知商家。

2) 利用公共服务机构

克隆 DNA 的载体或宿主菌(或细胞)，可以利用下列公共服务机构获取：

(1) 中国普通微生物保藏管理中心(CCGMC) (micronet.im.ac.cn/cgmcc/ jianjie. html)。
中国科学院北京微生物研究所(www.ctcccas.ac.cn/junzhong)：真菌、细菌。
中国科学院武汉病毒研究所(www.whiov.ac.cn)：病毒。

(2) 中国农业微生物菌种保藏管理中心(ACCC)(www.accc.org.cn)：农业微生物。

(3) 林业微生物菌种保藏管理中心(CAF)(www.forestry.ac.cn/shs/wsw/wsw. html)。

(4) 中国工业微生物菌种保藏中心(CICC)(www.china-cicc.org)。

(5) 抗菌素菌种保藏管理中心(CACC)。

(6) 医学微生物菌种保藏管理中心(CMCC)。

(7) 兽医微生物菌种保藏管理中心(CVCC)。

(8) 美国标准菌种保藏所(ATCC)(www.atcc.org)。

(9) 荷兰真菌中心收藏所(CBS) (www.cbs.knaw.nl)。

(10) 英国国立标准菌种保藏所(NCTC) (www.hpa.org.uk/srmd/div_cdmssd_ nctc)。

(11) 法国里昂巴斯德研究所(IPL) (www.pasteur.fr)。

(12) 日本大阪发酵研究所(IFO)(www.jhsf.or.jp)。

3) 接受馈赠

实验材料尚未产业化，或自己不能制备时，也可通过信函寻求外单位馈赠(最近大多数人喜欢使用 E-mail，但垃圾邮件的泛滥，可能造成你的求助信被误删)。在求助信中，应清楚地告诉对方：你需要什么？发表相关材料信息的出处。若对方提出与你签订合同，应及时、真实地将有关信息告知对方，不能隐瞒什么，因为这种合同往往仅是为了督促个人的信誉，不存在商业行为。通常是向论文通信作者寻求帮助。图 1-3 是一封求助信的样式，供参考。写信的稿纸应是印有单位标志、名称、电话号码等信息的公函纸。若没有，则可以使用计算机自制。



Department of Genetics and Cell Biology
College of Life Sciences, Nankai University
94 Weijin Road, Tianjin 300071, P. R. China [a]
Tel: 86-22-2350-xxxx
Fax: 86-22-2350-xxxx, E-mail: xxxx@nankai.edu.cn

a. 通讯地址按照单位的惯常写法。

Dr. B. B. Brown [b]
Department of Biology
Institute of Animal Physiology
123 Southwest 41 Street
New York
NY 12123-4567
USA

b. 应写上对方的称呼，若知道对方是教授，最好写成Prof.或 Professor。

16th, November 2005

Dear Dr. Brown,

I have read, with interest, your 1990 *J.Biol.Chem.* paper on the isolation of cDNAs encoding liver-specific transcription factor LSTF-1. I am working on transcription factor in the mammary gland. We have identified a novel form of LSTF in the mammary gland. We have identified a novel form of LSTF in the mammary gland and are in the process of isolating cDNAs for LSTF-like factors. *It would greatly facilitate my analysis if you could make your LSTF-1 clone available to me. Thank you in anticipation.*

Yours sincerely,
N. China
Nankai China, Ph. D.[c]

c. 注明学位或其他。

图 1-3　求助信样式

斜体部分的另一种写法①[d]

d. 注明更详细的内容及表达不强迫的语气，下画线部分为通用语句。

I therefore would very much appreciate if I could obtain a plasmid containing LSTF-1. The most suitable one for my purpose would be pBRLSTF-1 in your JBC paper. Of course, I would very much appreciate hearing from you soon and thank you very much in anticipation of your help.

斜体部分的另一种写法②[e]

e. 希望对方尽快给予回复。

It would be most helpful to have a LSTF-containing plasmid. Please do not hesitate to contact me if you would like more information. My fax number is (86)-22-3456-1234[f]. Thank you for your time.

f. 自己的传真号码可以不写国家代码。不要写城市区号前的0。

第二节　实验室规则与安全

1. 实验室规则

(1) 保持肃静。不许喧哗、打闹，创造整洁、安静、有序的实验环境。

(2) 保持整洁。实验时应穿工作服，书包等物品按规定放置整齐，不许随地吐痰。实验结束后，清洁器材和工作台，彻底清洗试管、烧杯等实验用品，物归原处，实验废品(如火柴棍、滤纸等)丢到指定地方，不得随意乱丢。

(3) 严格操作。认真预习，切忌盲目，做好准备，提高效率。实验时严格遵守操作

规程，仔细观察，做好记录，认真书写实验报告，不合格者必须重写。枪尖、滴管专用专放，以防交叉污染。使用仪器必须在教员指导下进行，不得随意乱动。使用微量移液器时，必须先熟读使用方法。玻璃器皿轻拿轻放。

(4) 注意节约。爱护标本、器材，节约试剂、水电，防止浪费。无故损坏酌情赔偿。

(5) 保证安全。室内严禁吸烟。用试管加热时，管口不能对着人。使用危险、有毒物品时严格按要求操作，使用同位素时应注意防护和防止污染。如有意外立即报告实验室管理人员。实验完毕，做好地面清洁卫生，关好门、窗、水、电等。

2. 实验室常识

(1) 使用贵重仪器如分析天平、分光光度计、离心机、微量移液器，应十分谨慎，加倍爱护，使用前，应熟知使用方法。若有问题随时请示指导教员。使用时，要严格遵守操作规程，如遇试剂溅污仪器应及时用洁净纱布擦拭。发生故障时，应立即关机，告知实验室管理人员，不得擅自拆修。

(2) 凡挥发性、有烟雾、有毒和有异味气体的实验，均应在通风柜内进行。用后试剂严密封口，尽量缩短操作时间、减少外泄，操作者最好戴口罩、手套。凡见光易变质的试剂，应用棕色瓶储存，或用黑纸包裹，或每次少量配制。

(3) 配制试剂时，应对试剂纯度、结构式、分子质量等特性熟悉，做到“有的放矢”。用过的器皿应及时用自来水浸泡，以便于清洗和减少对器皿的侵蚀。取用试剂或溶液后，需立即将瓶盖盖严，并放回原处。取出的试剂或溶液，如未用尽，切勿倒回瓶内，以免掺混。

(4) 量瓶是量器，不要用量瓶作容器。称量试剂，应用硫酸纸，不可用滤纸。标签纸的大小应与容器相称，标签上要写明试剂名称、规格、浓度、配制日期及配制人，标签应贴在试剂瓶 2/3 高度处。

(5) 洗净器皿应倒置架上，使其自然干燥，不能用抹布擦拭。

3. 实验室安全

生物实验室里，经常与毒性很强、有腐蚀性、易燃烧或有爆炸性的化学药品及传染性病毒、细菌等直接接触，必须十分重视安全工作。

(1) 严格执行 2004 年 4 月 5 日审定通过、2004 年 10 月 1 日正式实施的，由中华人民共和国科学技术部和国家认证认可监督管理委员会提出、中国实验室国家认可委员会负责起草的《实验室生物安全通用要求》(GB 19489-2004)。该国家标准对生物安全分级、实验室设施设备的配置、个人防护和实验室安全行为等方面进行了若干规定，要求生物工作者严格按不同等级水平和评价标准进行操作。

(2) 了解电闸、水阀门、煤气总阀门所在处，离开实验室时，一定要将室内检查一遍，应将水电、煤气等关好，门窗锁好。

(3) 使用电器设备(如烘箱、恒温水浴锅、离心机、电泳仪等)时，严防触电，绝不可用湿手或在眼睛旁视时开关电闸或电器开关。检查电器设备是否漏电时，应将手背轻轻触及仪器表面，凡是漏电的仪器，一律不能使用。

(4) 使用高温高压锅灭菌时，不得离人。易燃、易爆、腐蚀、有毒等试剂，绝不能

放在高温高压锅内灭菌，以防爆炸发生，造成人身伤亡。

(5) 使用可燃物，特别是易燃物(如乙醚、丙酮、乙醇等)时，应特别小心。如果不慎溅出相当量的易燃液体，应按下法处理：①立即关闭室内所有的电源和电加热器；②关门，打开窗户；③用毛巾或抹布擦拭溅出的液体，并将回收的液体拧到大的容器中，然后再倒入带塞的玻璃缸里。

(6) 凡使用腐蚀性试剂(如浓酸、浓碱等)，必须谨慎操作，防止溅出。对于挥发性酸应在通风柜内操作，同时应在下面放一大盘子，一旦洒出，立即用大量自来水冲洗。若溅在实验台上或地面上，必须及时用湿抹布或拖布反复擦洗干净，不得留痕迹。

(7) 废液特别是强酸和强碱不能直接倒在水池中，应先稀释，然后倒入水池，再用大量自来水冲洗水池及下水道。

(8) 有毒物品应按实验室的规定办理审批手续后方可领取，使用时严格操作，用后妥善处理。

4. 实验室急救

在实验过程中不慎发生意外事故时，不要惊慌，应立即采取急救措施。

(1) 触电。①关闭电源；②用干木棍将导线与被害者分开；③将被害者移至木板上，与地面分离；④急救者应做好防触电安全措施，手或脚必须绝缘。

(2) 火灾。先将电源关闭，移走一切易燃物品，并迅速将火扑灭。根据火势大小，可采用湿抹布、湿工作服、沙土、灭火器、灭火水龙头等灭火。但应注意，起火之物能与水混合者(如乙醇)方可用水灭火；不能与水混合者(如汽油、乙醚)因能浮于水面，更易扩大燃烧面积，因而不能用水灭火。衣服着火，切勿奔跑，以免火势加剧，可就地打滚压住着火部位，再以水浇灭。

(3) 烫伤。一般用乙醇消毒，然后涂 2%苦味酸或 5%鞣酸。若皮肤起泡，不要弄破水泡，防止感染。对于烧伤严重者，应用无菌纱布敷好伤口后，急送医院处理。

(4) 玻璃割伤或其他器械损伤。首先必须检查伤口内有无玻璃或金属碎片，然后用硼酸水洗净，再涂上碘酒，必要时用无菌纱布包扎。若伤口较大或较深而大量出血时，应迅速采取止血措施，同时送医院急救。

(5) 灼伤皮肤。①强碱：先用大量自来水冲洗，再用 5%硼酸溶液或 2%乙酸溶液涂洗。②强酸、溴：先用大量自来水冲洗，再用5% $NaHCO_3$溶液或 5%氨水溶液洗涤。③苯酚：用乙醇洗涤。

(6) 煤气中毒。到户外呼吸新鲜空气，严重时送医院处理。

?…Questions………………

1. 什么是 DNA 重组技术？其实验的主要目的是什么？
2. 试分析有些人工作很辛苦但总得不出理想实验结果的原因。
3. 如何获取你需要的实验材料(特别是未商品化的材料)？
4. 什么是《实验室生物安全通用要求》(GB 19489-2004)？据此生物学实验室可分几级？
5. 实验室发生火灾时该如何处理？烫伤、灼伤时该如何处理？
6. 在你所设计的实验方案中哪些试剂对环境有污染？如何处理这些试剂？

第二章　仪器操作与溶液配制

第一节　常用器皿与仪器

1. 塑料制品

DNA 操作中常用 1.5 mL 或 0.5 mL 的 Eppendorf 管等塑料制品，购买时应根据实验目的选择合适的产品，主要考虑其材质、透明度、强度、化学稳定性及耐热性等。半透明的聚丙烯产品是最常用的。不能选用那些易变色、难写字或盖不严的产品[a]。Eppendorf 管等小塑料制品可盛于铝饭盒或 1 L 玻璃瓶(用铝箔纸封口)中进行高温高压灭菌。

2. 微量移液器(枪)

生物学实验中通常使用移液管或头部呈毛细管式的微量注射器来移取溶液，但分子生物学实验中常用手动或电动微量移液器来移取溶液。

微量移液器[b,c]，俗称枪，与枪尖联合使用。其最大量程从 2 μL 到 10 mL 不等。不同量程微量移液器的使用方法大体相同，先将枪尖装在吸液杆上，再调节其刻度到量程范围内的某一个值，然后将推动按钮推到第 1 档后缓慢吸取溶液，若想排出枪尖里的溶液，则推到第 2 档[d](注意不要从第 2 档吸取溶液)(图 2-1)。购买的枪尖一般是大袋包装，应戴上干净手套将其装入枪尖盒中高温高压灭菌后使用。

3. 恒温水浴锅

酶促反应大多在恒温水浴锅[e]中进行，常用温度为 37℃，超过或低于该温度，可能需要使用更高温度量程的水浴锅或附加有制冷设备的水浴锅。反应时常将 Eppendorf 管插入到带有小孔的海绵或泡沫材料制成的浮漂中(右图)，使 Eppendorf 管漂浮于水面上进行酶促反应。

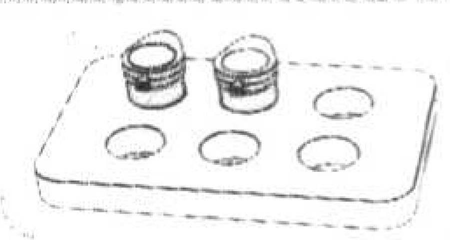
a. 用于冰箱中保存的塑料制品应避免选用那些易自动开盖及易被有机溶剂腐蚀的塑料制品。

b. 使用注意事项:①改变移液量程时应自大调到小。由小值调大时应先多调 1/3 圈再反调至设定值。移液器使用完毕宜将量程调到最大值。②更换的新枪尖应进行预洗，用于有机溶液时最好预洗 2~3 次。③操作移液器要平稳、缓慢。释放按钮时不可过快,以免液体吸入吸液杆内。④吸嘴内尚存液体时切勿将移液器平放或倒置,防止液体流进吸液杆内。⑤使用了强酸或其他腐蚀性溶剂后,应将移液器拆开,用蒸馏水清洗活塞和密封圈,完全干燥后再组装。⑥若刻度与实际取液量相差甚大,可以用精密天平检测其精度。若精度差别很大,则应送专业维修点去修理。

c. 微量移液器有不同的移液范围，超过其量程极易损坏其精度，而且不能再回复到原来位置，这点应特别注意。

d. 漏液时,可能是因为微量移液器内部润滑油已耗尽,或吸液杆头部破损所致,自己可以修复。

e. 水浴锅里的水应使用蒸馏水，并在使用前检查水浴锅中的水是否充足和干净。



4. 小型离心机

在分子生物学实验中，每天反复使用 Eppendorf 离心管进行离心操作，因此应购买

好的小型离心机。离心机一般能到 15 000 r/min。回收乙醇沉淀物时通常在低温下进行，因此离心机最好带有制冷装置。简单的离心甩干[f]等操作也是经常遇到的，因此也应备上更小的机型(如掌中型台式离心机)。台式离心机的溶液量可以用目测来平衡，但使用有盖子的转头进行离心时一定不要忘记给转头盖上盖子。离心机的转头有水平、吊式、角式三种类型，角式是最常用的(图 2-2)。

f. 甩干，即短时间(1~3 s)的离心操作，是为了使附着于管壁上的液体沉入管底。



图 2-1　微量移液器的结构及使用方法

图 2-2　各种离心机的转头

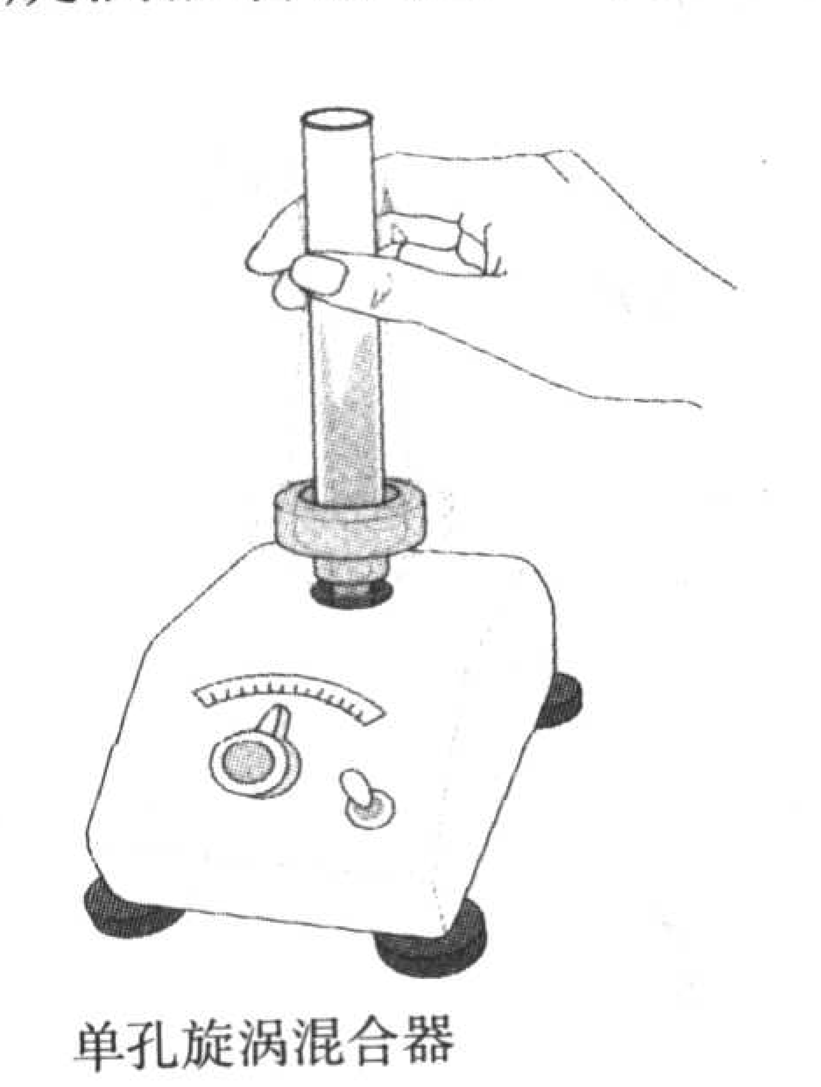
5. 离心干燥机

乙醇沉淀后，为了使 Eppendorf 管内的 DNA 干燥，常用真空泵。此外，也可用小型离心干燥机等仪器使 DNA 样品快速干燥。

6. 旋涡混合器

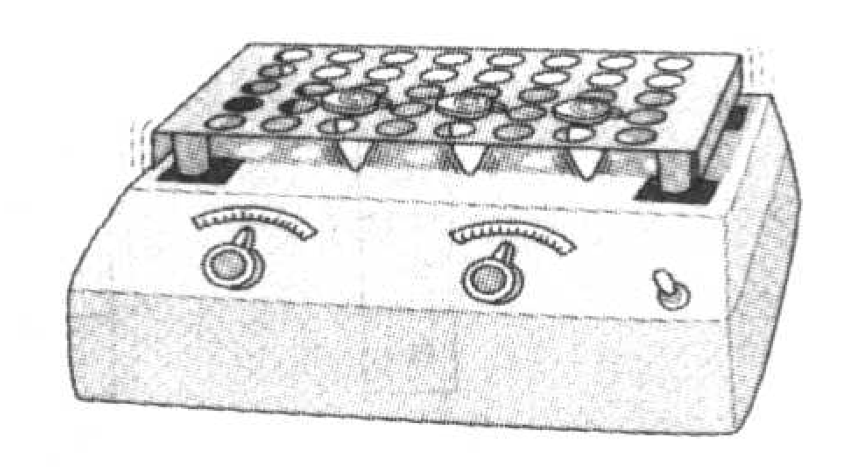
不对称的旋转可以混匀管内的溶液，根据这个原理制成的装置叫旋涡混合器。目前市场上销售的旋涡混合器有多种类型，大多为接触式。Eppendorf 管底部一旦接触混合器

的橡胶头就产生旋涡转动，带动 Eppendorf 管内的溶液产生振荡，从而使溶液混合均匀。旋涡振荡频率能调节的机型也有销售，此外还有多个 Eppendorf 离心管同时旋转混合的多孔旋涡混合器(图 2-3)。



单孔旋涡混合器

用手倾斜地拿着 Eppendorf 管,让其底部多次接触转动的橡胶头,能很好地使内盛的液体混匀

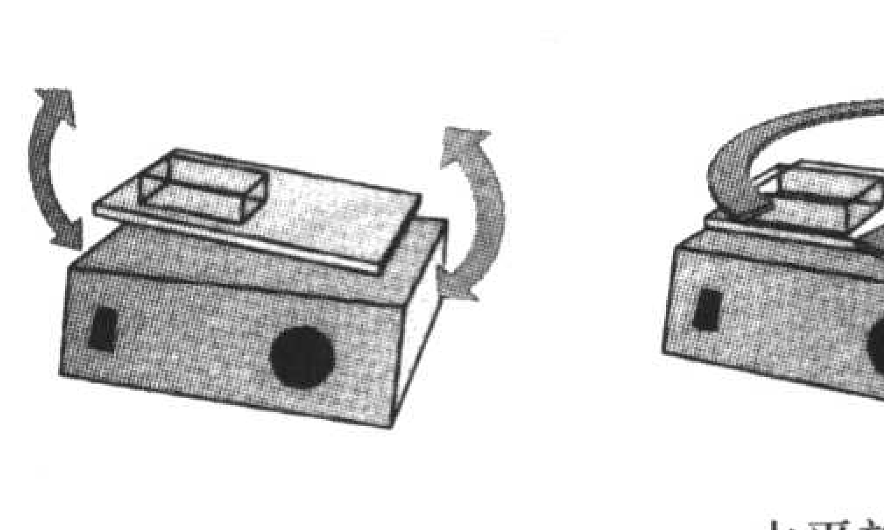


多孔 Eppendorf 旋涡混合器

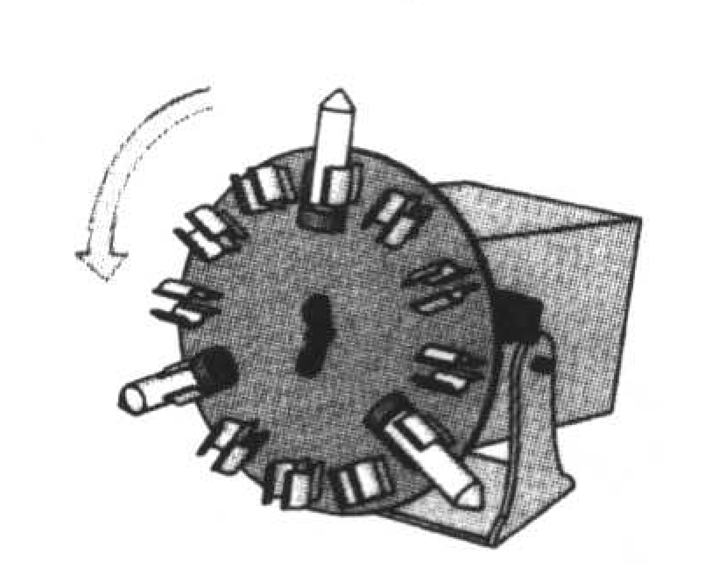
图 2-3　各种旋涡混合器

7. 振荡器

搅拌离心管内的溶液、加速难溶物的溶解、清洗浸泡于溶液中的不洁器皿等操作常使用振荡器。根据振荡方式，有摇摆式、水平旋转式、水平往复式、多角度旋转式等多种类型(图 2-4)。



摇摆式　　水平旋转式



多角度旋转式

图 2-4　各种类型的振荡器

8. 真空泵

真空泵是利用真空吸走液体的装置。在乙醇沉淀后经常用它吸走残留的乙醇，其作用与离心干燥机或凝胶干燥机类似。机械式装置带有漏水阀，可防止溶液直接流向机器内。一般来说，简单的真空泵装置已足够用于分子生物学操作，甚至可以用水流泵来代替机械式装置。

9. 紫外发光装置

紫外发光装置内的紫外灯所发射的紫外线，通过特殊的过滤板过滤出特定的波长。此装置有封闭式(从装置下面发射紫外线)和简易手持式两种类型(图 2-5)。根据过滤板种类紫外线可分为短波(254 nm)、中波(312 nm 或 302 nm)和长波(366 nm)等类型。短波光线强，对 DNA 损伤大；长波对 DNA 损伤小，光线弱。实验中一般使用中波，此时能清

楚地看见染上溴化乙锭的DNA。防护板上方贴有一层起保护作用的保鲜膜，凝胶放于其上。用眼睛直接观察紫外线是非常危险的，应戴上防护眼镜，并使用防护板。灯管及过滤板有使用寿命，使用完毕后应尽快关闭电源(图2-5)。

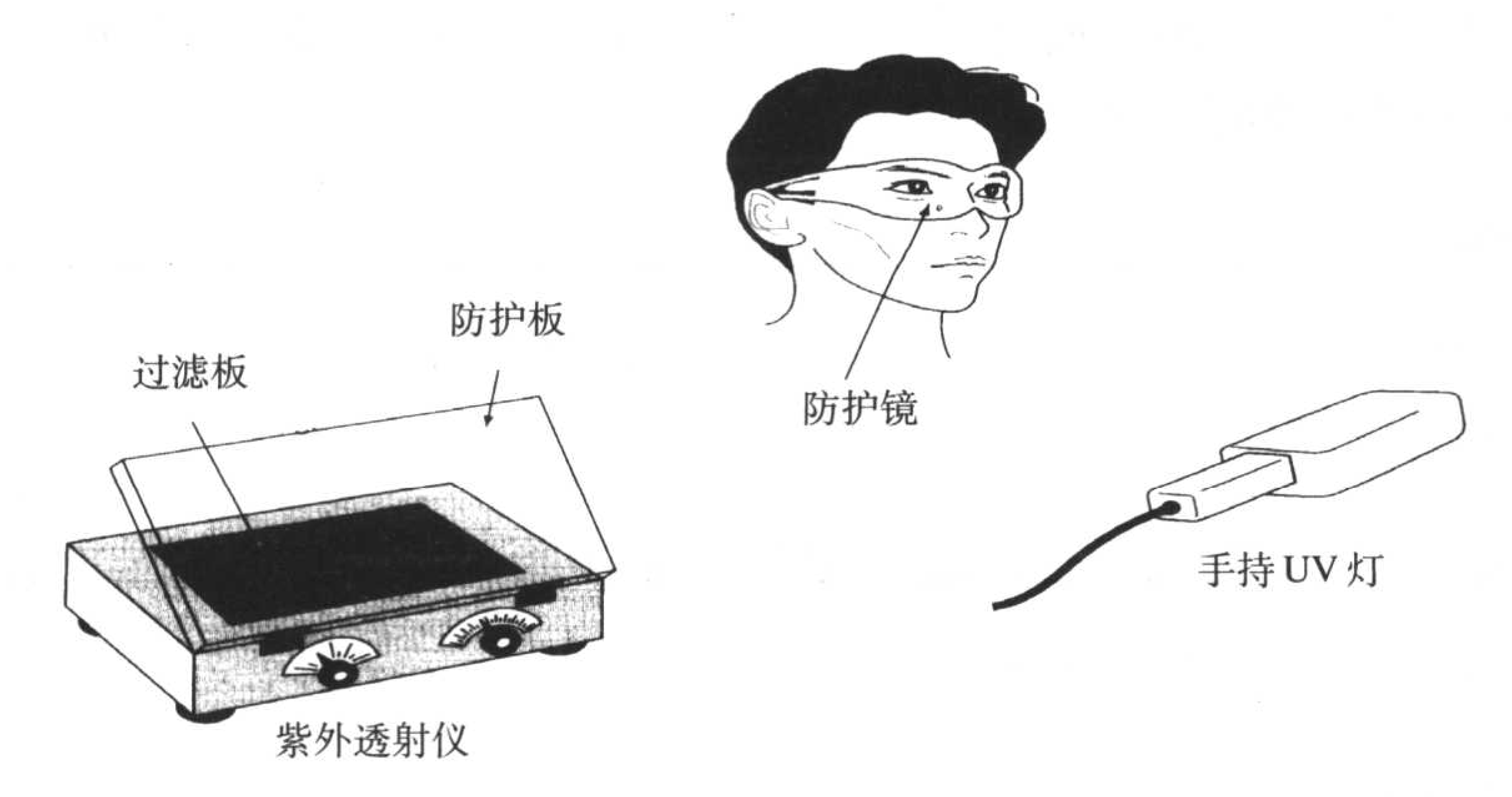


图2-5　紫外发光装置

10. 一次性手套

一次性手套有多种类型。塑料薄膜制的一次性手套最便宜，但容易掉落和破损；橡胶制的一次性手套结实，但手感不好。为了增加橡胶手套内侧的柔滑性，也有在内侧表层涂有滑石粉的产品销售。一次性手套的应用：①防止危险试剂沾到手上；②防止试剂受到污染。

11. 纸巾

实验中使用到各种各样的纸巾。吸走残留液体时，使用市售卫生纸足够了，但擦拭实验用品(如玻璃板)时需要专用的、不带毛屑的面巾纸。为了隔离一个干燥的空间，可以用大的滤纸(最好是Whatman公司的No.1)或铝箔纸。

第二节　溶　　液

1. 实验用水

过去常用蒸馏水，但随着净化水装置的开发，最近多用结合反渗透膜、离子交换、活性炭吸附等技术的纯水装置(如Milli-Q纯水器)制成的纯净水。

1) 一蒸水

与离子交换蒸馏水差不多，多用于大肠杆菌培养基的制备、电泳缓冲液的配制、器皿的漂洗等实验。

2) 双蒸水

一蒸水再次蒸馏而成，与纯净水的纯度差不多，用于生物化学及组织培养实验。

2. 储液

实验中使用的溶液分为储液和工作液。储液是保存用的溶液，配制后一般分装成小瓶，供配制工作液用。常用储液见附录一。下面以 500 mL、0.5 mol/L EDTA (pH8.0)储液的制备为例说明溶液的配制。

Materials

(1) Na_2EDTA 盐

(2) NaOH 溶液(pH10.0)

(3) NaOH 颗粒

Protocols　　Time：20 min

ⓐ 称取 94 g Na_2EDTA，倒入烧杯。

↓

ⓑ 加 450 mL 双蒸水，搅拌均匀。

↓

ⓒ 边搅拌边缓缓加入 NaOH 颗粒，调 pH。

↓

ⓓ 随着 pH 上升，EDTA 逐渐溶解。

↓

ⓔ EDTA 溶解后，改用 NaOH 溶液(pH10.0)微调 pH 至 8.0，用双蒸水定容至 500 mL。

3. 试剂称量精度

基因操作实验中，一般的称量精度有 3 位有效数字就足够了。如配制 500 mL 浓度为0.5 mol/L的相对分子质量为 121 的试剂，称重 30.3 g，用 500 mL 量筒(最小刻度为 5 mL)定容即可，不必称取精度达 30.250 g。因为不是分析化学实验，不必使用容量瓶来定容。

4. 试剂灭菌

为防止试剂在保存过程中产生杂菌，试剂配制后应高温高压灭菌，并存放于暗处。有些试剂不可采用高温高压方式灭菌，而采用过滤灭菌，这些试剂有：①遇热易分解的试剂；②易挥发的试剂；③有机溶剂；④腐蚀性、刺激性强的试剂。

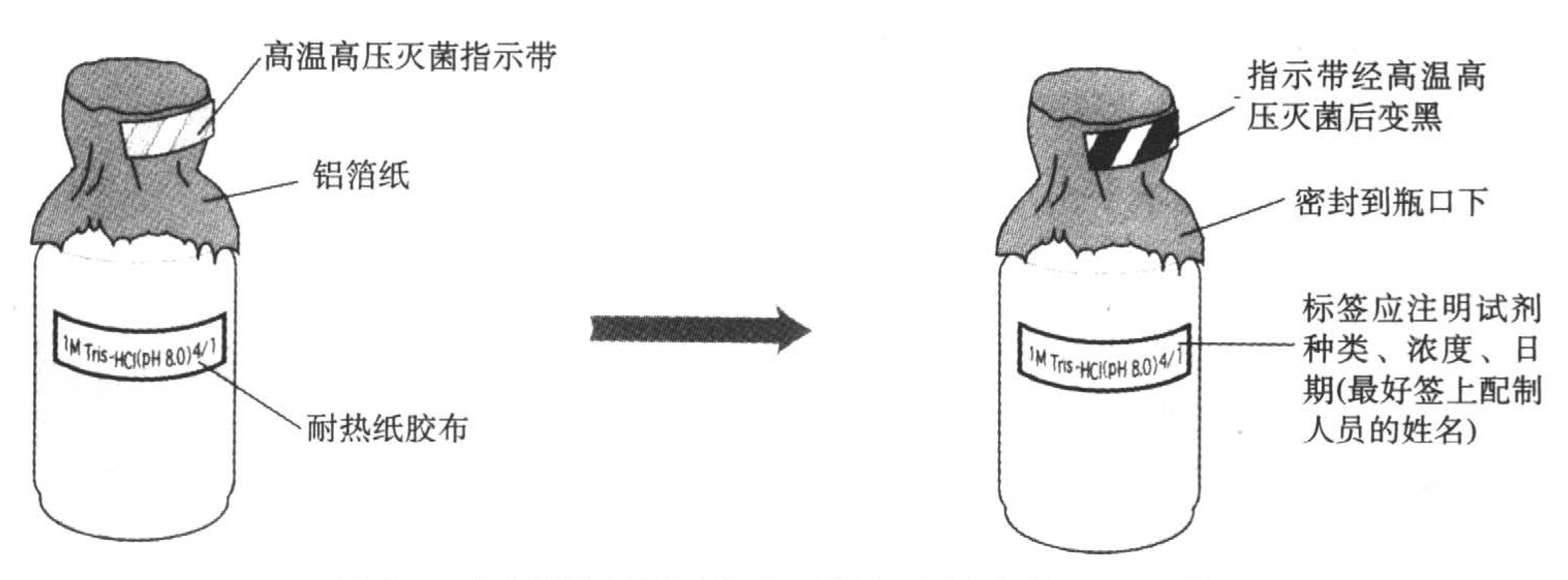


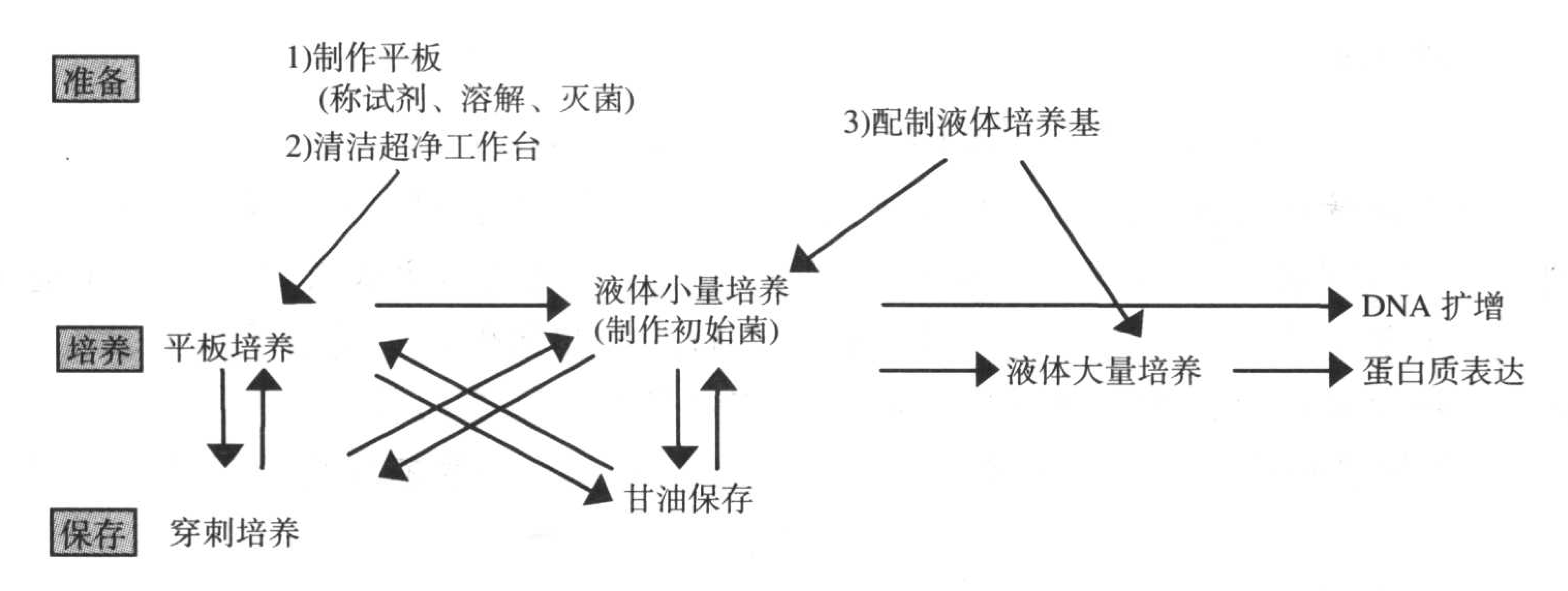
图 2-6　用高温高压灭菌指示带明确溶液是否已灭菌

磨口瓶盛装的试剂在高温高压灭菌时，应注意加液量不能超过规定刻度，瓶口与瓶盖间夹一铝箔纸，以利于通气，瓶口还应使用铝箔纸裹上，并贴上高温高压灭菌指示带。指示带在灭菌后会变黑(或变蓝)(图 2-6)。灭菌完成后应戴上线手套取出试剂瓶，以防止烫伤手。试剂瓶取出后应使之自然冷却。

…Questions………………

1. 如何正确使用微量移液器？使用中应特别注意哪些事项？
2. 如何改变微量移液器的移液量？应自大调到小，还是自小调到大？为什么？
3. 哪些试剂需要高温高压灭菌？哪些试剂不能采用高温高压方式灭菌？对于不能采用高温高压方式灭菌的试剂如何灭菌？灭菌后的试剂如何保存？是否需要分装？
4. 分子生物学实验中，哪些简易仪器或装置可以代替真空泵的作用？
5. 分子生物学实验中，哪些溶液可以用旋涡混合器混匀？哪些不可用旋涡混合器混匀？为什么？
6. 配制培养基时，通常使用哪种级别的水？为什么？

第三章　大肠杆菌培养与保存



大量扩增目的 DNA 或使目的基因表达出目的蛋白质，常以大肠杆菌为宿主菌。将重组的环状 DNA(质粒)或噬菌体 DNA 导入大肠杆菌细胞内，在适当培养基中培养大肠杆菌以扩增出目的 DNA。扩增质粒 DNA 的过程见图 3-1。

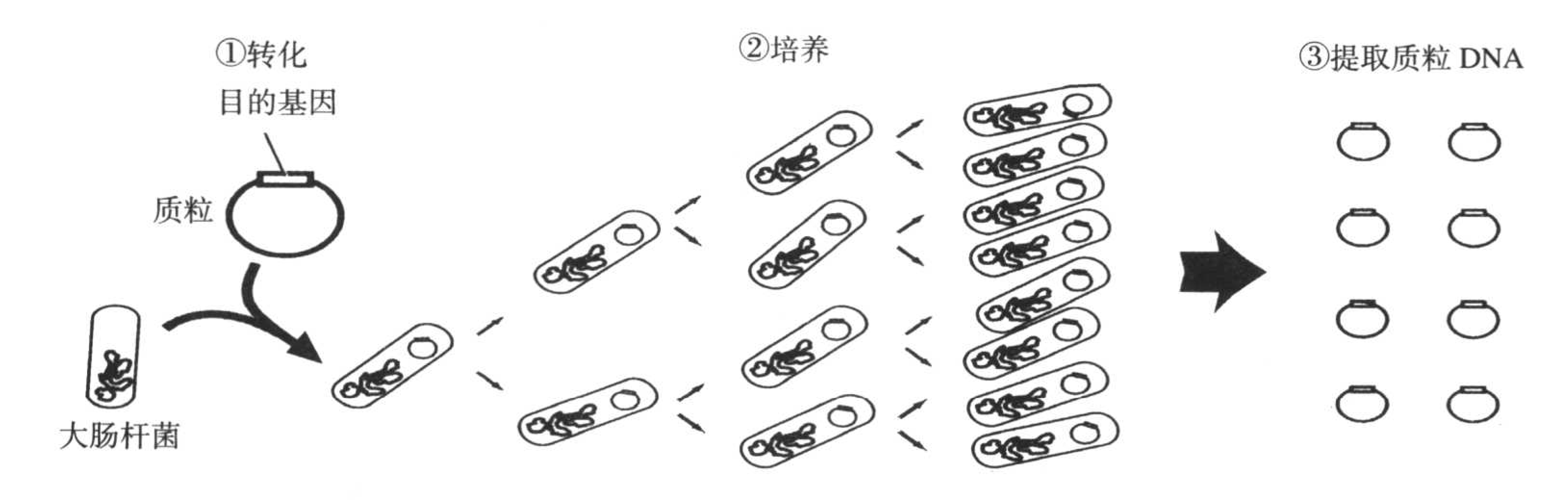


图 3-1　利用大肠杆菌扩增质粒 DNA

第一节　培养前准备

1. 大肠杆菌菌株

用于分子生物学实验的大肠杆菌菌株主要来自 K12[a]，常用菌株名称及其主要基因见表 3-1，根据试验目的及载体种类选择相应菌株[b]。

a. 根据菌体表面糖蛋白成分(O 抗原、H 抗原、K 抗原等)进行分类。
b. HB101、JM109、DH5α、BL21 (DE3)的感受态细胞自制或可从生物公司购买。

表 3-1　常用大肠杆菌菌株及特征

菌株	*recA*	F′	*sup*	*mcrA*	*mcrBC*	*EcoK*	*rps*	*gyr*	特征
HB101	–	–	*supE*	+	–	r^-m^-	Str^r	+	用于一般的转化实验
JM109	–	+	*supE*	–	+	r^-m^+	+	Nal^r	能对 pBlueScript、pUC 重组体进行蓝白筛选
DH5α	–	–	*supE*	–	+	r^-m^+	+	Nal^r	能进行蓝白筛选，转化率高

续表

菌株	*rec*A	F′	*sup*	*mcr*A	*mcr*BC	*Eco*K	*rps*	*gyr*	特征
BL21(DE3)	+	−	+	+	+	r^-m^-	+	+	来自 B 菌株，蛋白酶活性低。具有 T7 RNA 聚合酶基因，能使重组于 pET21b(+)多克隆位点的目的基因诱导出目的蛋白质

注：各基因特征：

• *rec*A：ATP 依赖型 DNA 重组酶基因缺失，能稳定插入 50 bp 以上重复 DNA 序列，对 DNA 转化有利。

• F′：具有重组的 F 因子，可作 M13 噬菌体的宿主菌。

• *sup*E：表达的阻遏蛋白与终止密码子 UAG 结合，使蛋白质合成终止。其缺失体不能表达阻遏蛋白，即使遇到 UAG 终止子，蛋白质仍能继续合成，并将 UAG 编码成谷氨酰胺，因此称 *sup*E 为琥珀突变抑制因子。

• *mcr*A、*mcr*BC：特异性地切割外源 DNA 甲基化序列的限制性内切核酸酶基因，进行高等动植物基因组 DNA 操作时使用其缺失体菌株。

• *Eco*K：参与限制与修饰系统。若想避免限制反应，使用其突变株。

• *rps*(Str^r)：耐 50 μg/mL 链霉素。

• *gyr*(Nal^r)：耐 100 μg/mL 奈啶酮酸。

2. 培养大肠杆菌所需的物品

1) 大肠杆菌接种用操作台

如图 3-2 所示。

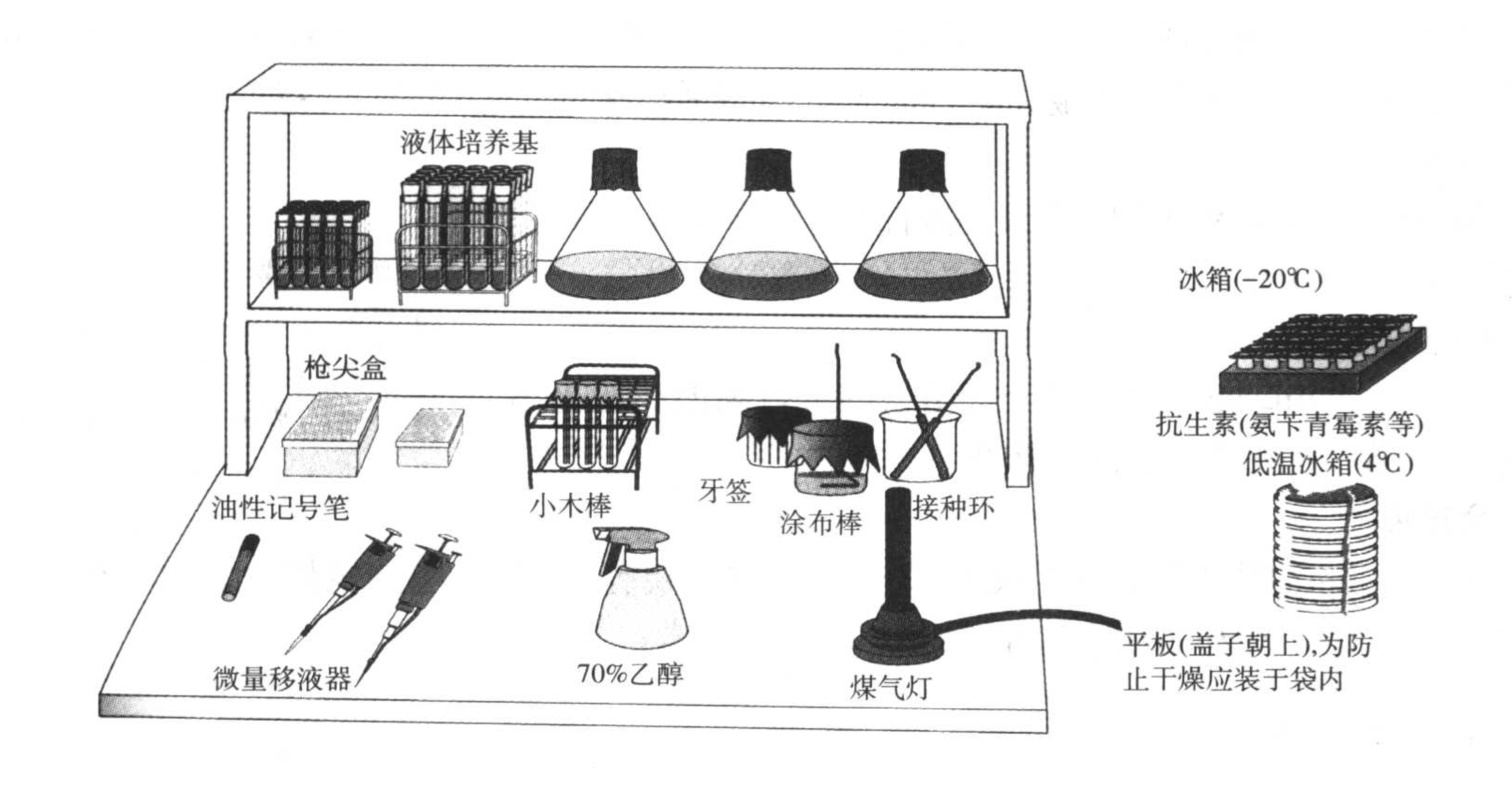


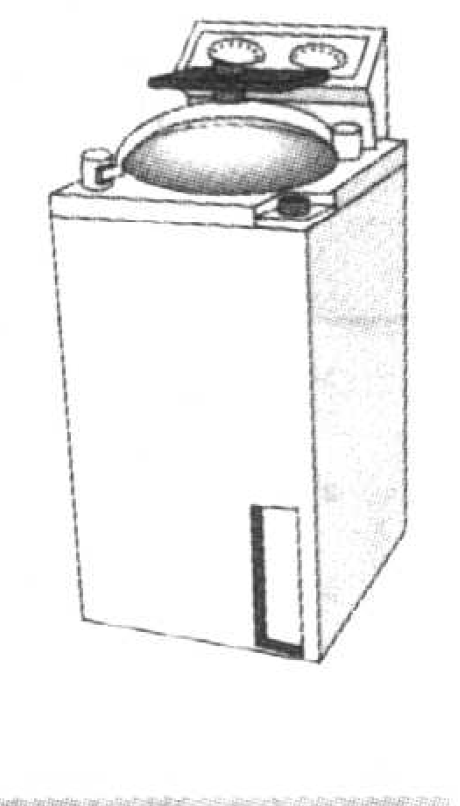
图 3-2　大肠杆菌实验中所用物品

2) 灭菌方法

大肠杆菌生长的环境也适合杂菌的生长，因此培养大肠杆菌的所有试剂及器皿等均应灭菌，防止杂菌[a]的生长。灭菌的方法有：

a. 杂有与实验无关菌(霉菌或细菌)，称之为污染。

A) **高温高压灭菌**(右图)



用于培养基、试剂、枪尖、小木棒、牙签等物品的灭菌，加热至121℃、15 ppsi(1 ppsi=6.894 76×10^3 Pa)条件下灭菌 20 min。待灭菌的物品应贴上高温高压灭菌指示带[b]。

B) **干热灭菌**

烧杯等玻璃器皿[c]及药匙等金属器具在 180℃烤箱中加热 1~2 h。玻璃管等小物品盛于金属容器内灭菌。

C) **火焰灭菌**

试管的瓶口、接种环等常用火焰灭菌(煤气灯或酒精灯)。火焰产生上升气流，对空气中漂浮的杂菌也有杀灭作用，因此也可净化空气、防止污染。

b. 灭菌完毕的物品用红线或黑线标记，以指示其是否已灭菌。

c. 湿的玻璃器皿干热灭菌易爆裂，应干燥后再进行干热灭菌。

D) **紫外线灭菌**

器械及培养基可用超净台里的紫外灯照射 10 min 来达到灭菌的目的。

E) **乙醇灭菌**

实验人员的手、器械、操作台面可用 70%乙醇灭菌。

3) 接种工具

A) **接种环**

头部为圆形铂金丝[d]。用于液体培养基的接种及平板划线。也有直接使用较硬的线形铂金丝进行高浓度琼脂平板接种。

d. 铂金丝比较昂贵，可用镍铬合金代替。

B) **小木棒**

装于试管内或裹于铝箔纸内进行高温高压灭菌，用于从平板向液体转接细菌。

C) **牙签**

盛于 100 mL 烧杯内或裹于铝箔纸内进行高温高压灭菌，用于从菌落[e]中挑选需要的单菌落。

e. 所谓菌落是固体培养基中众多菌的集合体。各菌落之间或许连接非常紧密。一个菌落来自同一菌体，挑选单菌落培养可获得单一的菌株。

D) **涂布棒**

玻璃在煤气喷灯上烧制而成(图 3-3)。存放于装有 100%乙醇的烧杯内，用时在酒精灯上灼烧片刻，冷却后用于向平板上涂布液体菌体。

3. 培养基种类

1) 液体培养基

盛于试管或三角瓶的液体状的培养基，用于大量繁殖菌株以提取质粒 DNA 或表达的目的蛋白质等。

2) 固体培养基

在液体培养基内添加琼脂，使之具有固定形状的培养基平板。用于平板培养、穿刺培养等，目的是使菌落增殖到一定大小，以获取噬菌斑或分离出单菌落。

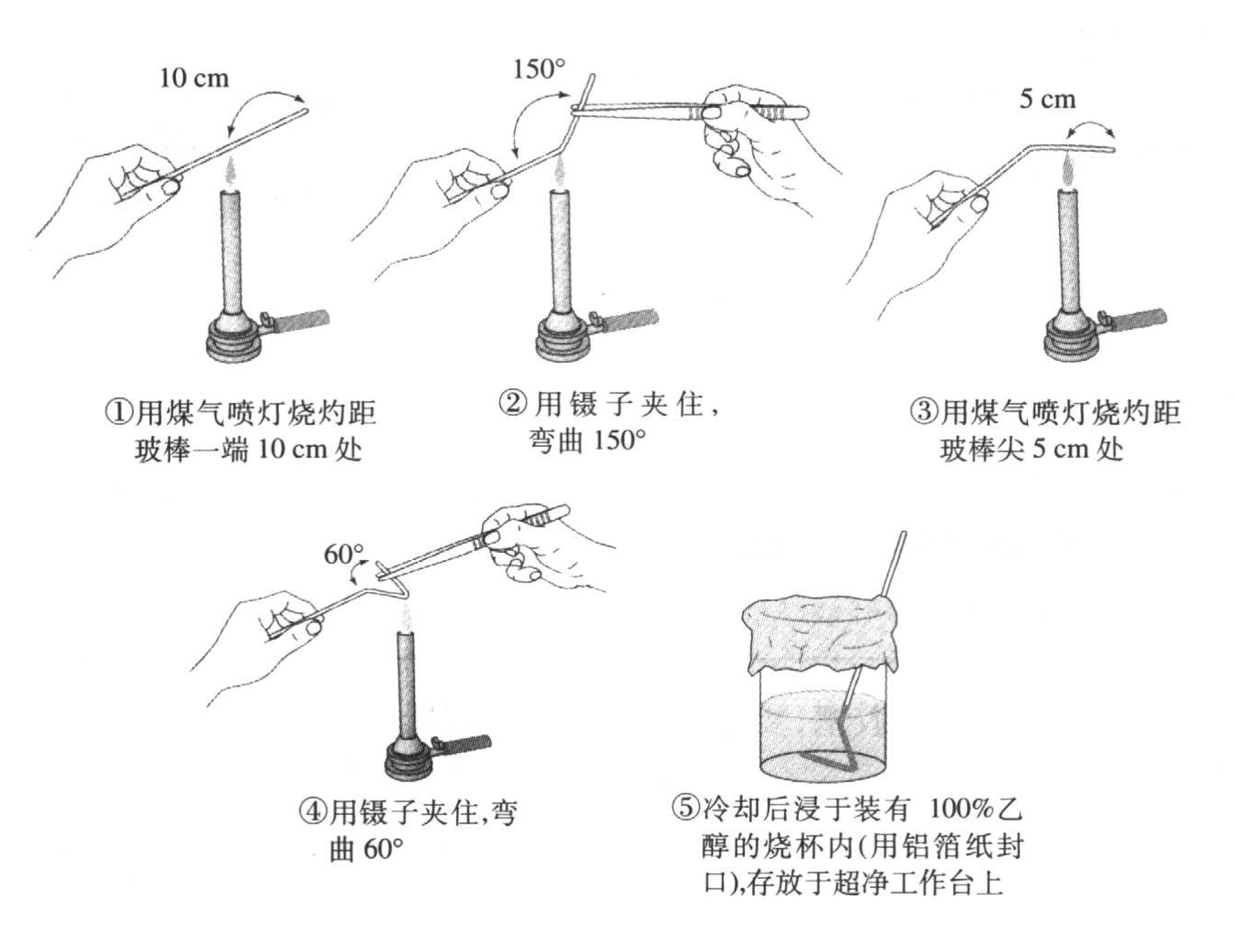


图 3-3　涂布棒制作方法

3) 抗生素

质粒中通常含有抗药基因，因此可作选择标记，也可在培养基中添加抗生素，防止杂菌生长。各种抗生素储液浓度及工作浓度见附录一。

A) 抗生素储液的配制

根据储液浓度配制到无菌烧杯或无菌离心管中，分装成每份 1 mL 于 Eppendorf 管中，保存于−20℃。用无菌水为溶剂的抗生素，配制后用 0.22 μm 滤膜过滤灭菌后再分装。

Protocols　　　　Time：20 min

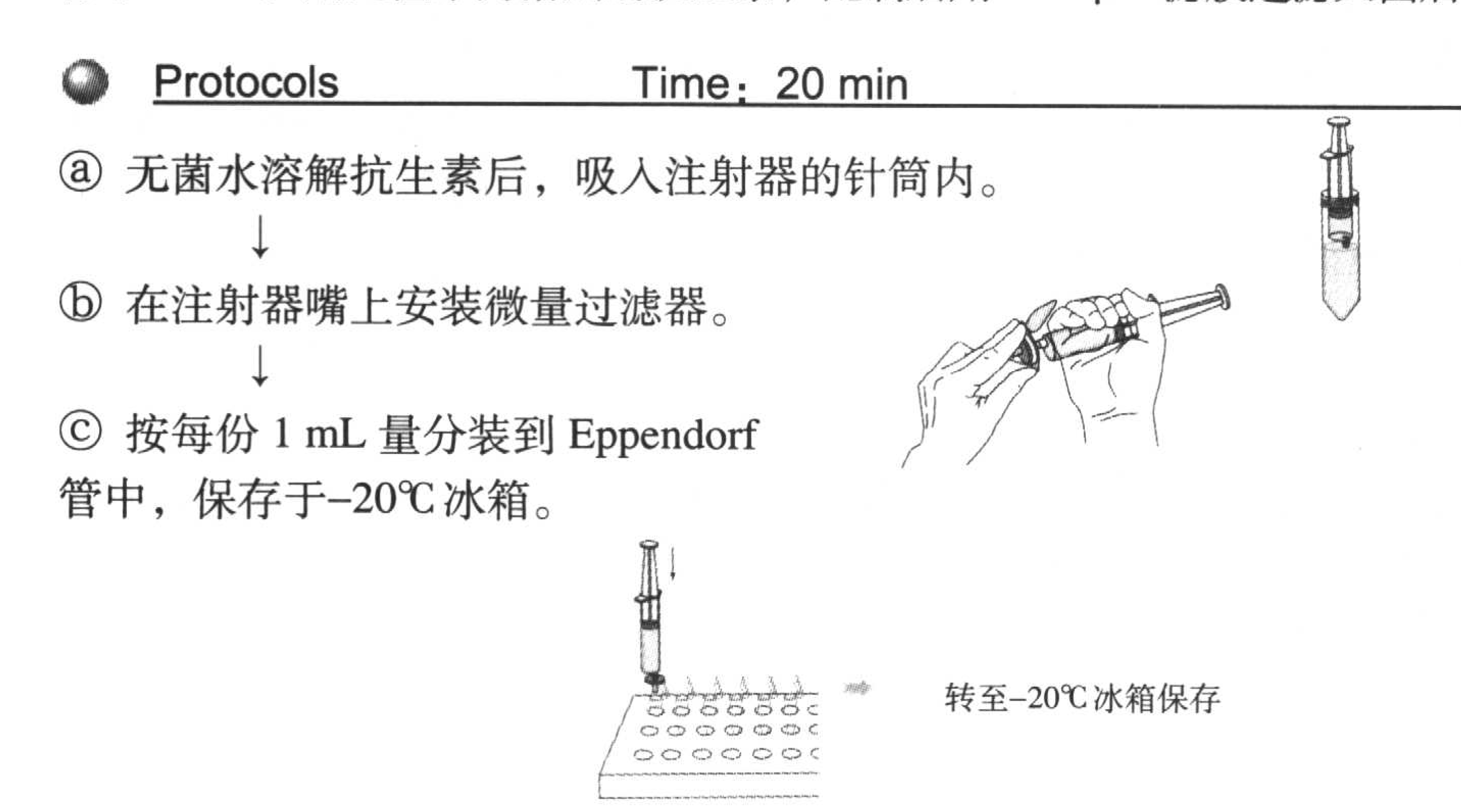
ⓐ 无菌水溶解抗生素后，吸入注射器的针筒内。

↓

ⓑ 在注射器嘴上安装微量过滤器。

↓

ⓒ 按每份 1 mL 量分装到 Eppendorf 管中，保存于−20℃冰箱。



B) 抗生素的使用

在接菌前将需要量的抗生素加入到液体培养基[a]中。在配制固体培养基时，待高温高压灭菌后冷却至一定温度时再加入抗生素。

a. 氨苄青霉素是最常用的抗生素，添加氨苄青霉素的 LB 培养基叫 LA 培养基。

4. 培养基的配制

1) 液体培养基的配制

配制后可立即分装成小份，每份量为实验需要的量，如 2 mL、10 mL、20 mL 等。

A) 小体积 LB 培养基的配制(以 2 mL 量为例)

Materials

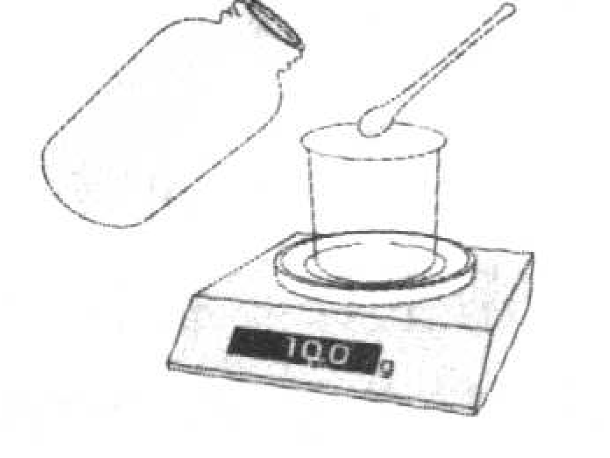
(1) 试管及配套瓶塞(棉塞或胶塞，要求通气性好)
(2) 药匙
(3) 1 L 烧杯
(4) 搅拌器及搅拌转子
(5) 连续式分装器
(6) LB 培养基所需要的试剂(附录一)

Protocols　　Time：2 h

ⓐ 胰蛋白胨(Bacto)	10 g
酵母提取物(Bacto)	5 g
NaCl	10 g

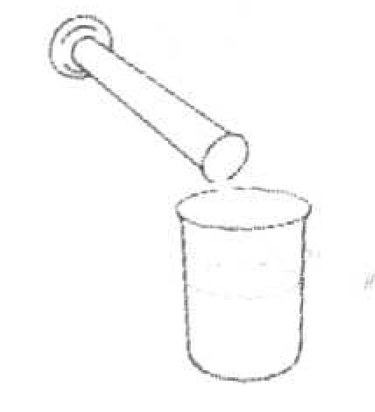
移至 1 L 烧杯中(右图)[a]

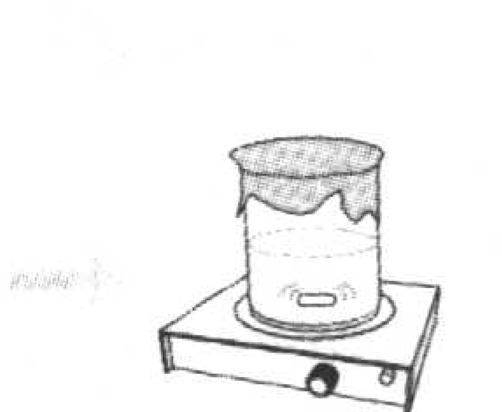
↓



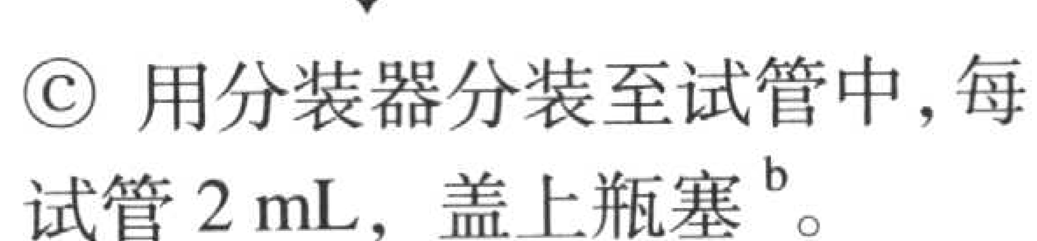
小数点后一位即可

ⓑ 加双蒸水至刻度，用搅拌器混合均匀。





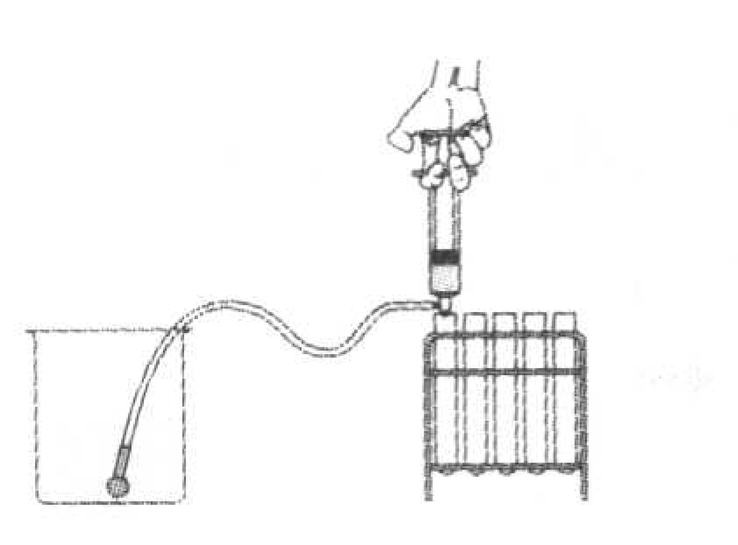
↓

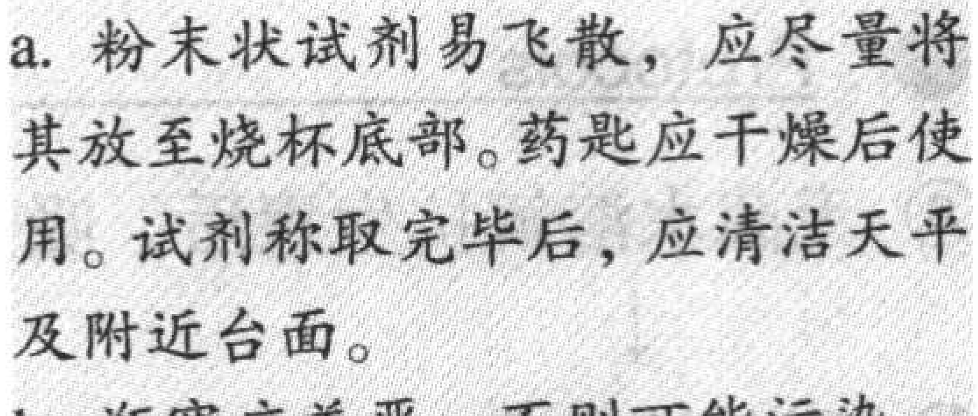


ⓒ 用分装器分装至试管中，每试管 2 mL，盖上瓶塞[b]。

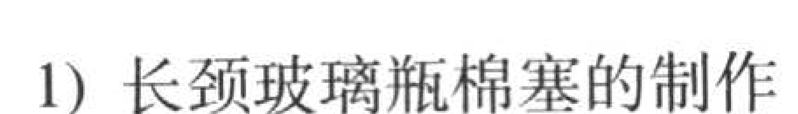
↓

ⓓ 高温高压灭菌，室温保存。





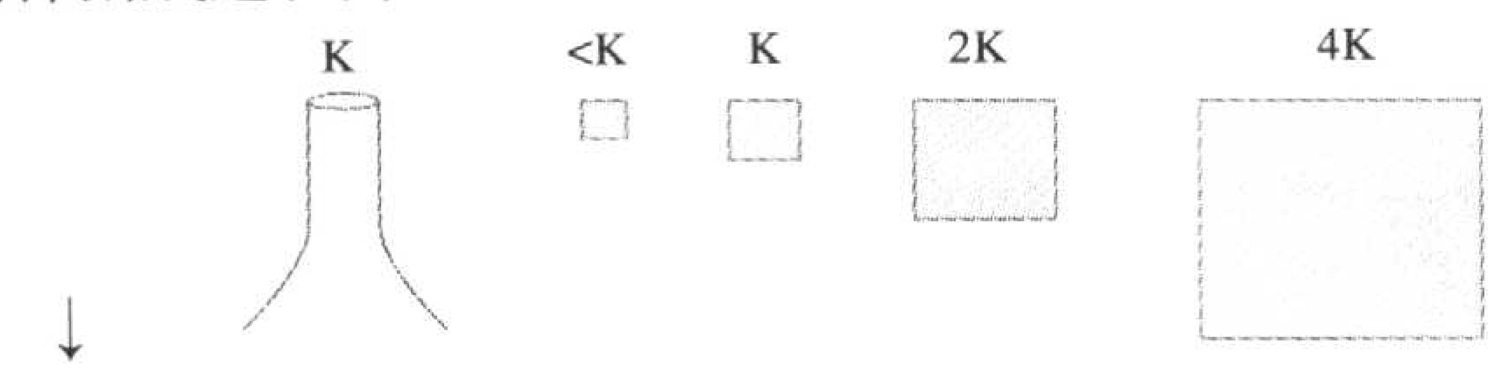
a. 粉末状试剂易飞散，应尽量将其放至烧杯底部。药匙应干燥后使用。试剂称取完毕后，应清洁天平及附近台面。
b. 瓶塞应盖严，否则可能污染。



…Tips………………

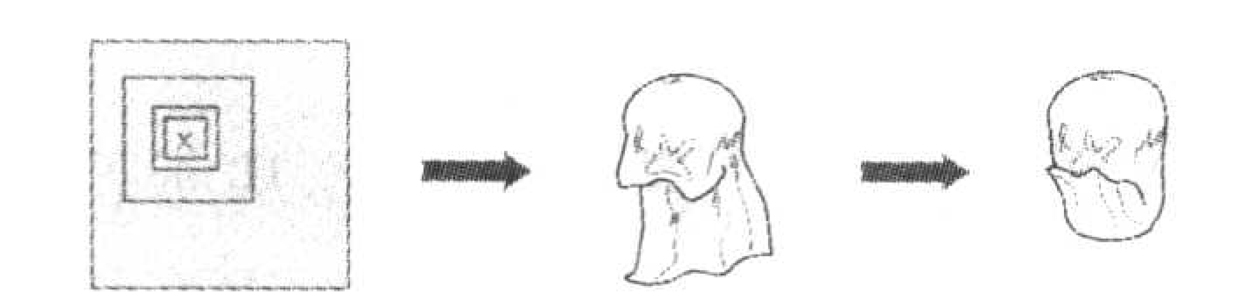
1) 长颈玻璃瓶棉塞的制作

ⓐ 假设玻璃瓶的直径为 K cm，将 5 mm 厚的脱脂棉撕成 4K cm、K cm、(<K) cm 的正方形，将 1 cm 厚的脱脂棉撕成边长为 2K cm 的正方形。

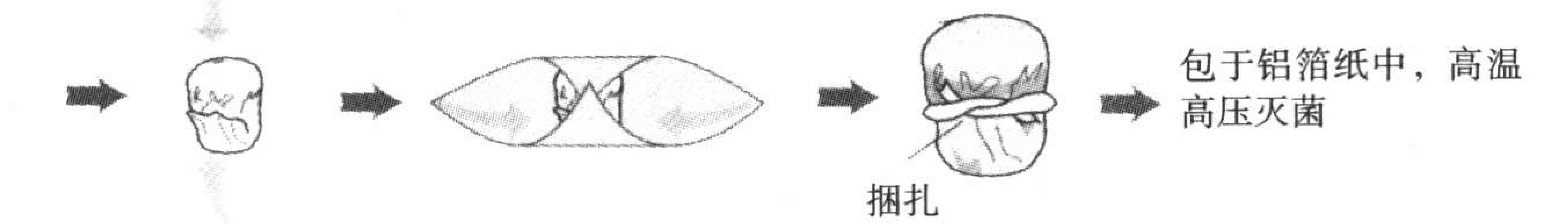


↓

ⓑ 将 4 份脱脂棉按大小顺序叠加起来，以“×”印为中心，用最大的脱脂棉包裹起来，长的一边反折回去。

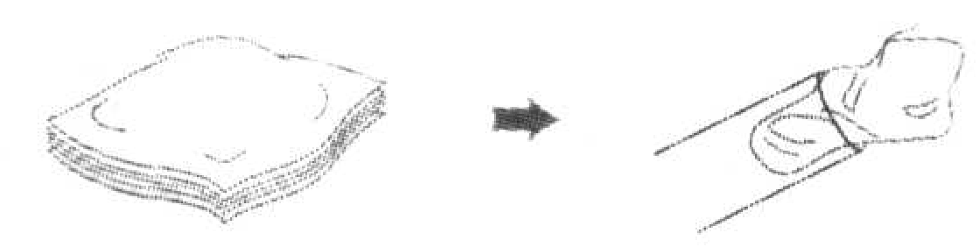


ⓒ 用一张较大的纱布包裹后，再用线绳捆扎，再进行高温高压灭菌。



2) 试管用棉塞的制作

将 1 cm 厚的脱脂棉用手指捻成试管口大小，高温高压灭菌。



B) 大体积 LB 培养基的配制(以 800 mL 为例)

Materials

(1) 药匙

(2) 2 L 三角瓶

(3) 铝箔纸

(4) 电动搅拌器及搅拌转子

(5) LB 培养基所需试剂(附录一)

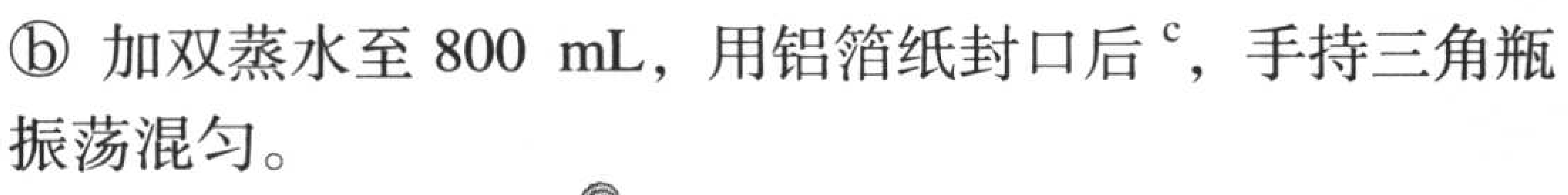
Protocols　　　　Time：2 h

ⓐ

胰蛋白胨(Bacto)	8 g
酵母提取物(Bacto)	4 g
NaCl	8 g

用药匙取药至三角瓶中称重(右图)

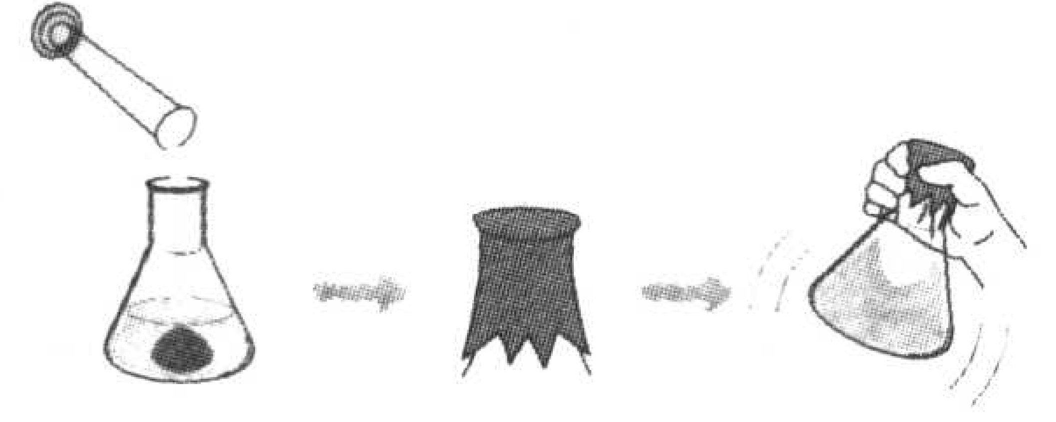
↓



ⓑ 加双蒸水至 800 mL，用铝箔纸封口后[c]，手持三角瓶振荡混匀。

c. 铝箔纸易破，所以最好封两层。铝箔纸应远远大于瓶口，过小则易导致污染。高温高压灭菌过程中，试剂将溶解掉，所以轻轻晃匀即可，晃动时注意不要将培养液晃至瓶口，这样将可能致污染。

↓



ⓒ 高温高压灭菌，室温保存。

2) 制作平板

Materials

(1) 煤气灯或酒精灯

(2) 水平台面

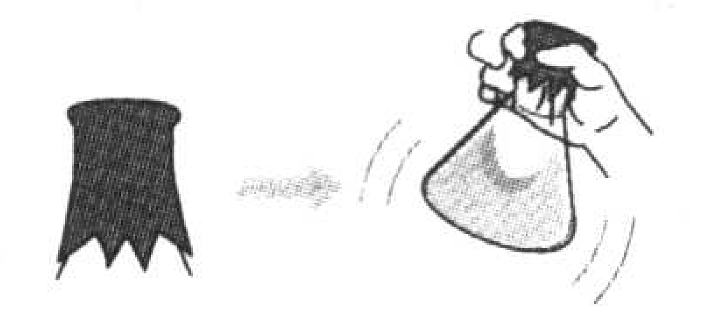
(3) 1 L 三角瓶
(4) 铝箔纸
(5) Φ=9 cm 培养皿
(6) 药匙
(7) LB 培养基所需试剂(附录一)
(8) 琼脂粉(DIFCO 公司产品)

Protocols Time：4 h

ⓐ

胰蛋白胨(Bacto)	8 g
酵母提取物(Bacto)	4 g
NaCl	8 g

用药匙取试剂至三角瓶中称重(右图)，加双蒸水至 1 L

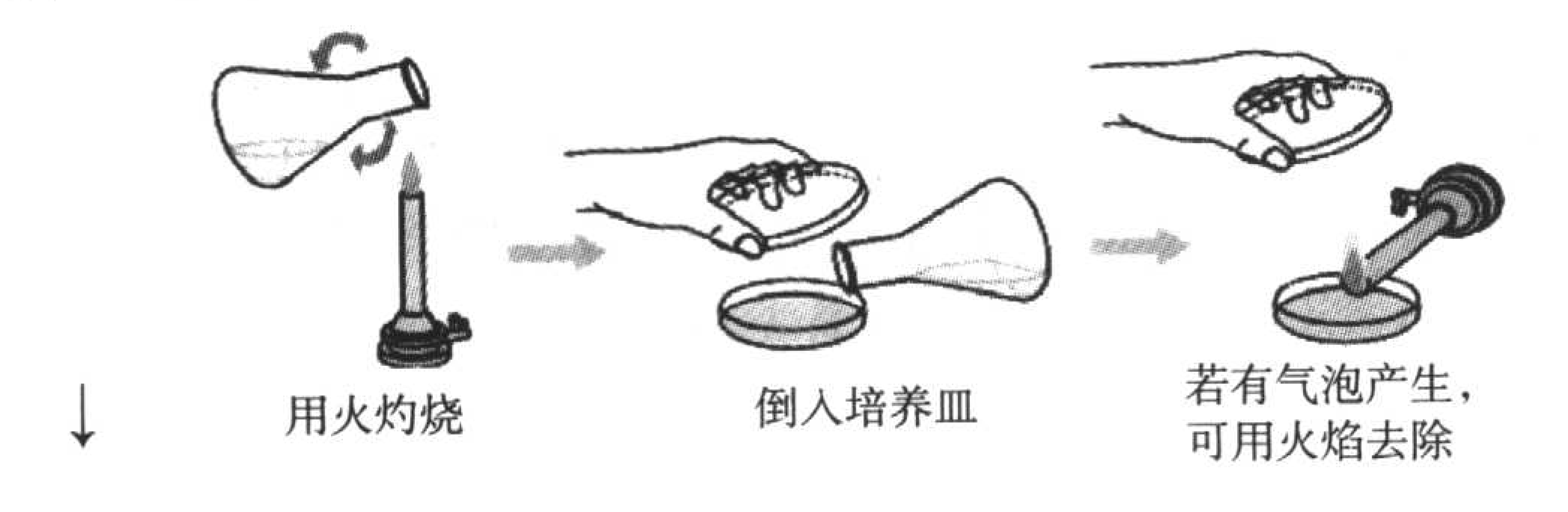


↓

ⓑ 铝箔纸封口，用手振动混匀后高温高压灭菌。

↓

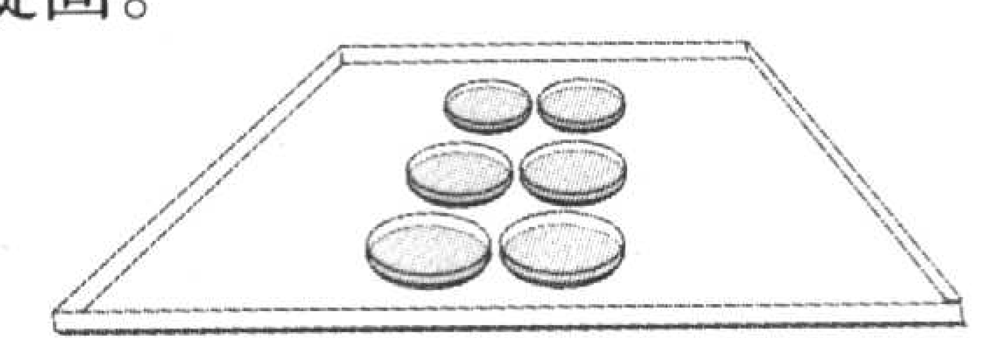
ⓒ 待培养基冷却至手能触摸的温度(60℃左右)时[d]，分装至培养皿中[e,f]。



d. 培养基中若需要添加抗生素，此时添加。
e. Φ=9 cm 平皿，每皿 25 mL 最适，因此 1 L 培养基可制作 40 皿平板。
f. 平皿开盖时间尽量短。分装出来的培养基将很快凝固(特别是在冬季)，因此操作上尽量快。

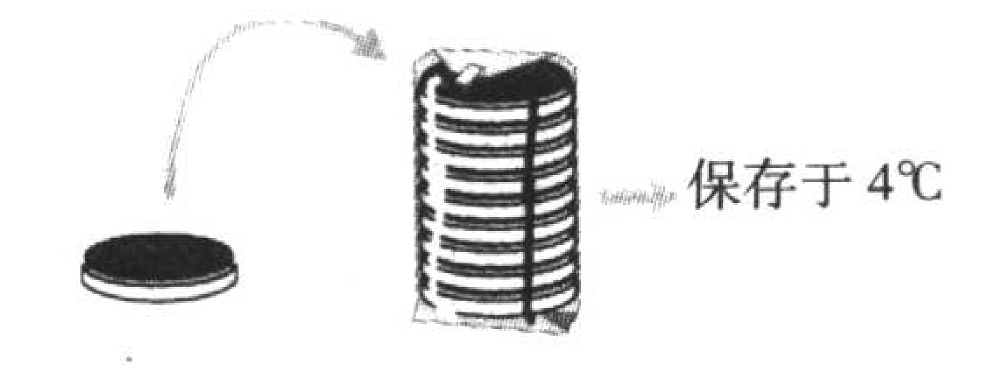
↓

ⓓ 在水平台面上凝固。



↓

ⓔ 凝固后，反转过来，装入塑料袋，4℃保存[g,h]。



g. 凝结在盖上的水珠可能导致污染，因此应倒转存放。
h. 氨苄青霉素易失活，因此添加抗生素的平板应在数周内使用。

第二节 大肠杆菌培养

1. 大肠杆菌培养的注意事项

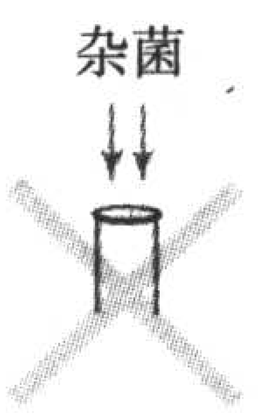
(1) 无菌操作前用 70%乙醇消毒台面。

(2) 在离酒精灯或煤气灯较近区域内进行无菌操作。因为煤气灯产生上升气流，能防止空气中飘落下来的细菌所带来的污染。使用煤气灯或酒精灯时应防火灾发生。

(3) 在开盖前和开盖后用煤气灯灼烧试管或三角瓶的瓶口 2~3 次。

(4) 开盖的试管或三角瓶的瓶口不能垂直向上，而应倾斜，以防止飘落下来的杂菌导致污染(右图)。

(5) 平皿是倒置保存的，在保存过程中盖子内侧可能有凝结的水珠，使用平皿时，应尽可能去掉这些凝结在盖子上的水珠，以减少污染。此外，不要混淆不同平皿的盖子。





2. 培养

1) 小量液体培养

Materials

(1) 接种针或小木棒

(2) 煤气灯

(3) 摇床

(4) 2 mL LB 液体培养基(附录一)

(5) 长有细菌的平皿

Protocols　　Time：8~16 h(操作 5~10 min)

(1) 用接种针接种

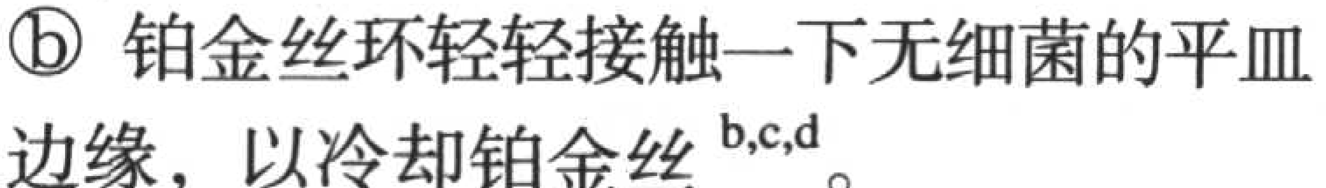
ⓐ 烧红接种针的环状铂金丝[a]。

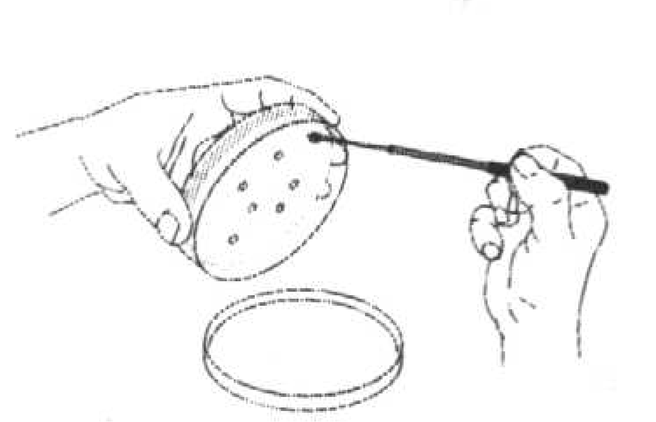


a. 不仅是铂金丝区，柄的金属区也应短时间烧灼。

↓

ⓑ 铂金丝环轻轻接触一下无细菌的平皿边缘，以冷却铂金丝[b,c,d]。





b. 平皿倒置，拿住培养基边缘，进行该操作。

c. 开盖的时间尽可能短。

d. 尽量不要将培养基面朝上。

↓

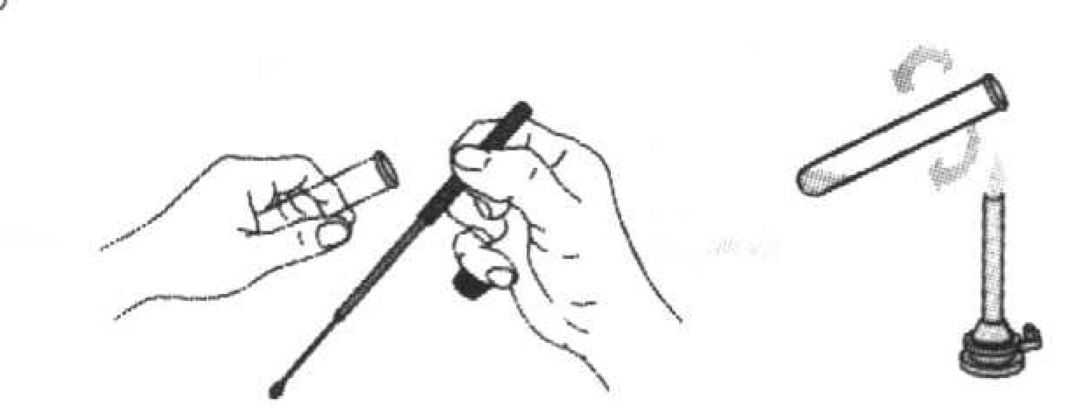
ⓒ 用铂金丝挑取一个菌落。

↓

ⓓ 灼烧待接种试管口，开盖[e]。

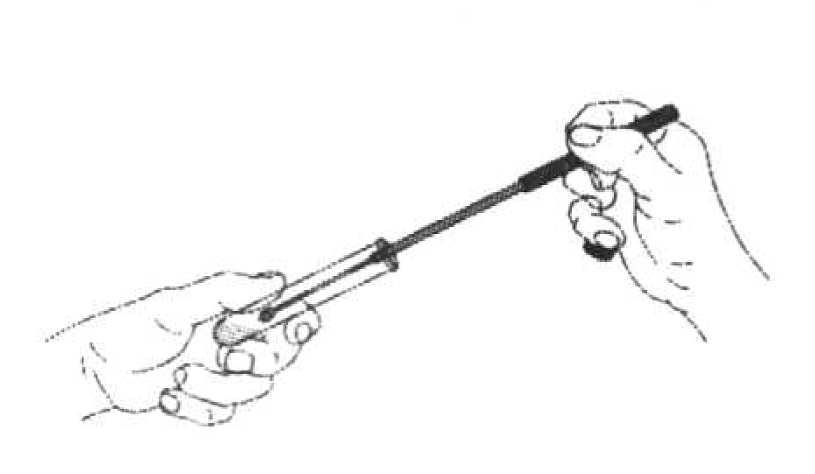
e. 用持接种针手的小指打开瓶盖。

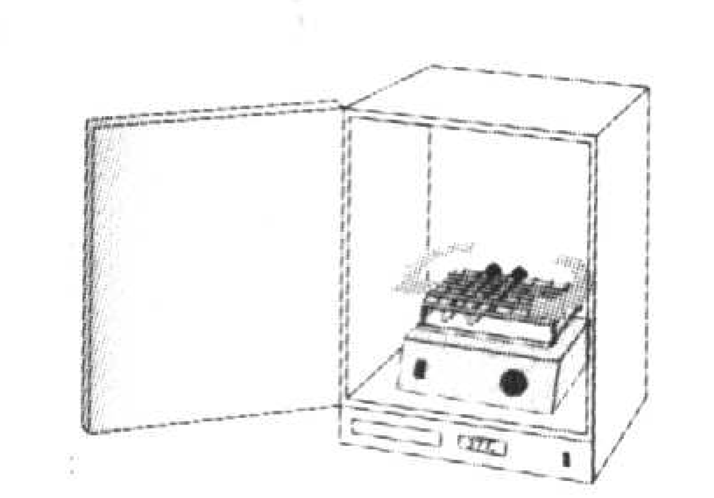




↓

ⓔ 将铂金丝伸进液体培养基内。





↓

ⓕ 37℃振荡[f]过夜(8~16 h)，转速通常为 100~250 r/min。

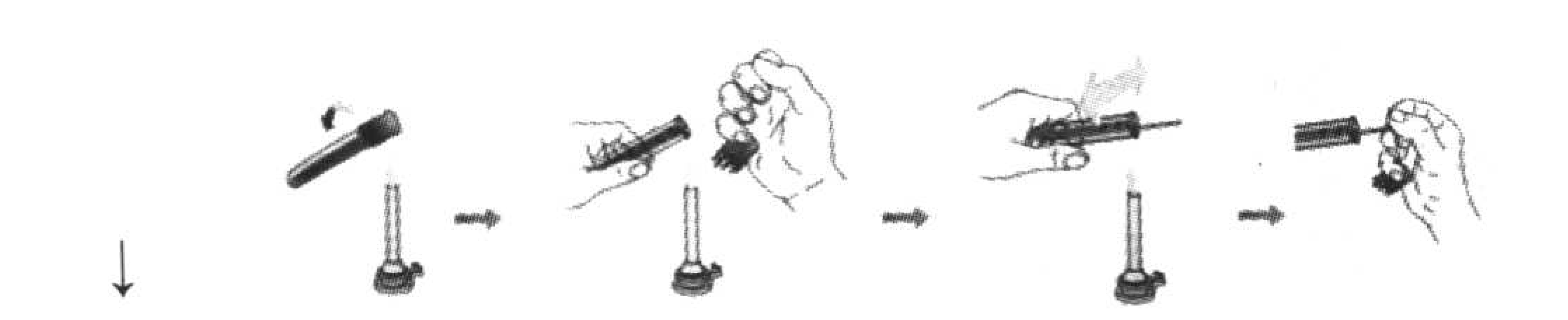
(2) 用小木棒接种

ⓐ 装小木棒的瓶口用煤气灯灼烧灭菌，转动瓶子摇出小木棒，取一根[g]。

f. 为了接触更多的空气，培养时试管应倾斜。

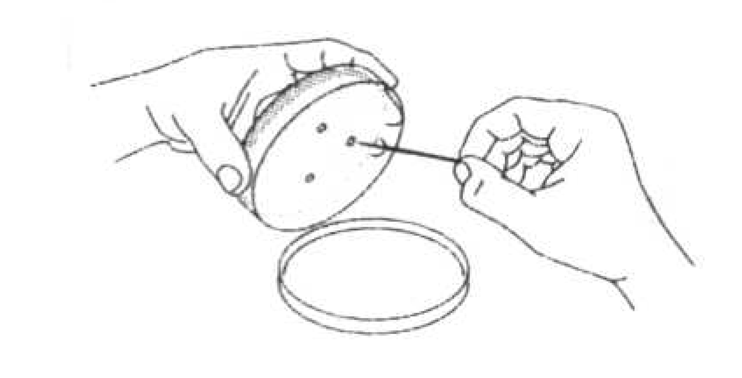


g. 手不要触及不用的小木棒。



↓

ⓑ 用小木棒一端挑起一个单菌落。



↓

ⓒ 以后的操作完全类同于接种针的方法。

2) 大量液体培养

大量液体培养时，最好不要直接接菌到大体积培养基中，而应先进行小量液体预培养(这些培养菌叫初始菌)。这是因为接种菌在培养基中的密度很低，若带有杂菌将使大量培养后的液体培养基中带有较多的杂菌；而且接种菌量很少，需要培养较长时间，添加的抗生素可能失活。

Materials

(1) 煤气灯

(2) 摇床

(3) 少量初始菌

(4) 800 mL LB 液体培养基(附录一)

Protocols Time：2 d (操作：小量培养 5~10 min，大量培养 5 min)

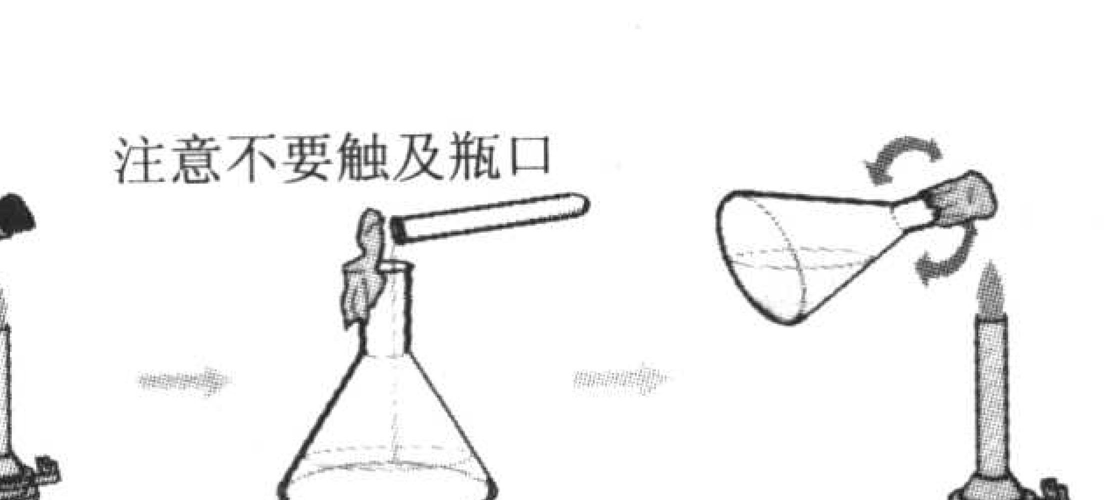
ⓐ 小量培养数小时至过夜。

↓ O/N

ⓑ 稍微打开盛有大体积培养液的三角瓶瓶盖，灼烧瓶口。

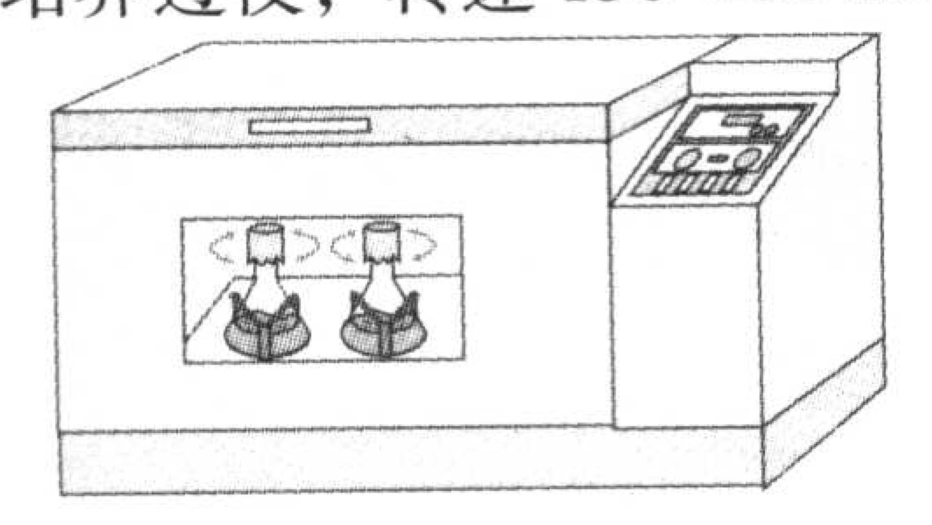
↓

ⓒ 打开有初始培养菌的试管口，灼烧，将初始培养菌转入大量培养基中，盖上盖子，再灼烧瓶口。



↓

ⓓ 37℃振荡培养过夜，转速 150~250 r/min [h,i]。



h. 大量培养时，应平衡放置，否则易损坏摇床。培养瓶若为奇数，用装有水的三角瓶来平衡。

i. 往返式摇床，速度可低些。旋转式摇床有利于细菌生长。

3) 菌数测定

用分光光度计测定液体培养基中的菌量。培养时间及菌数的关系见图 3-4。在 37℃下，对数生长期的大肠杆菌每 20~30 min 增殖 1 倍。



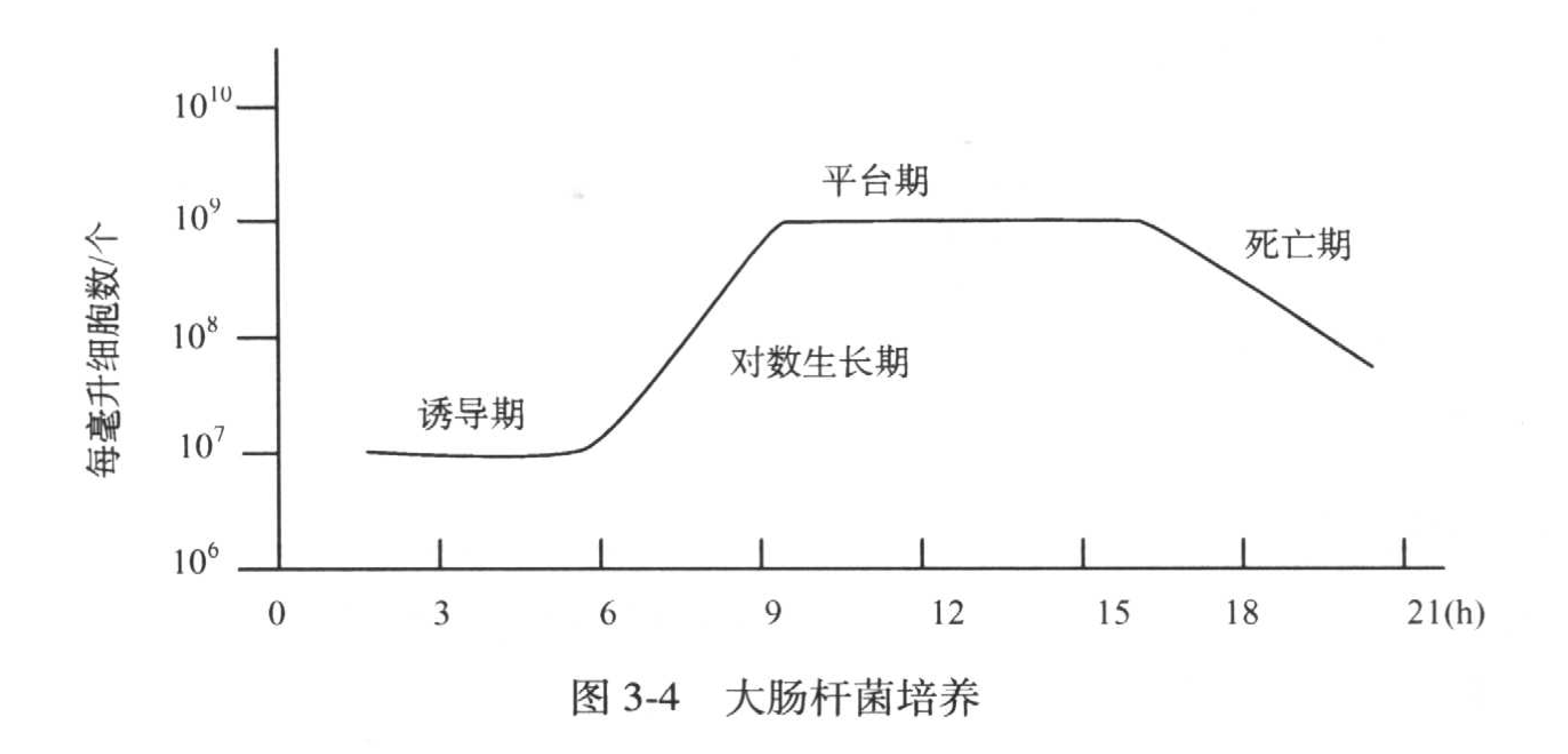
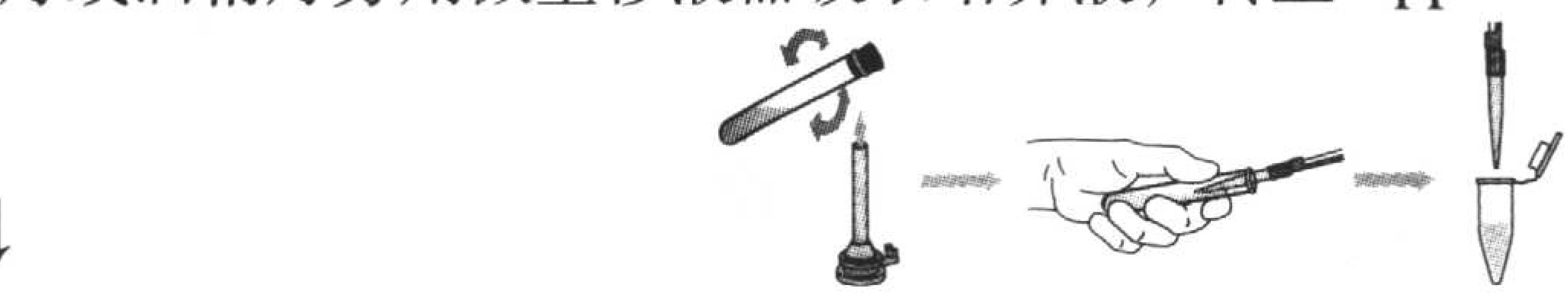


图 3-4　大肠杆菌培养

Protocols　　Time：5 min

ⓐ 在煤气灯或酒精灯旁用微量移液器吸取培养液，转至 Eppendorf 管。



↓

ⓑ 打开分光光度计开关，调整波长至 600 nm。

↓

ⓒ 吸取未接菌的培养基至比色杯中，调整光吸收值为零。

↓

ⓓ 取 Eppendorf 管内的菌液于比色杯中，测 A_{600} 值[j,k,l]。

j. 测定过程中，细菌仍在生长中，因此，操作要快。
k. A_{600}=0.2~1.0 时，为指数生长期，A_{600}>1.0 为平台期。
l. A_{600}=1.0 时，细菌数约为 10^8 个/mL。

4) 平板培养

A) 划线培养

Materials

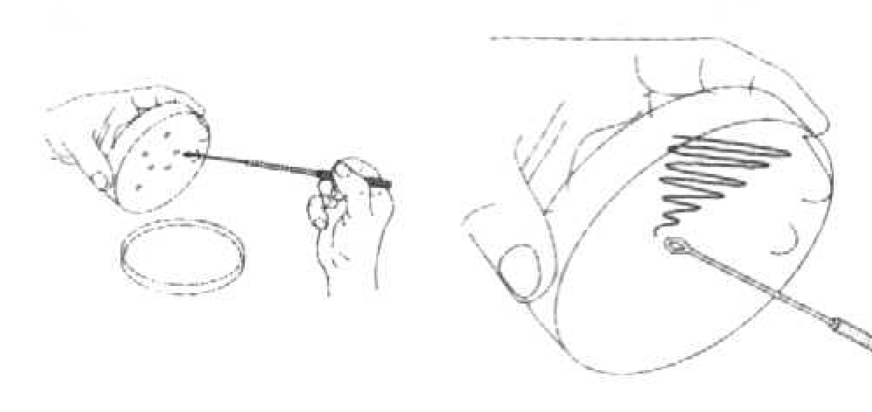
(1) 接种针
(2) 煤气灯或酒精灯
(3) 新的 LA 平板
(4) 菌(长有细菌的平板、甘油冻存管、转化完毕的感受态细胞等)

Protocols　　Time：8~16 h(操作 10~15 min)

ⓐ 用煤气灯将接种针烧红，轻触平板一侧，使之冷却。

↓

ⓑ 用铂金丝挑取平板上的单菌落(或将接种针伸进菌液中)，在培养基表面上划线。



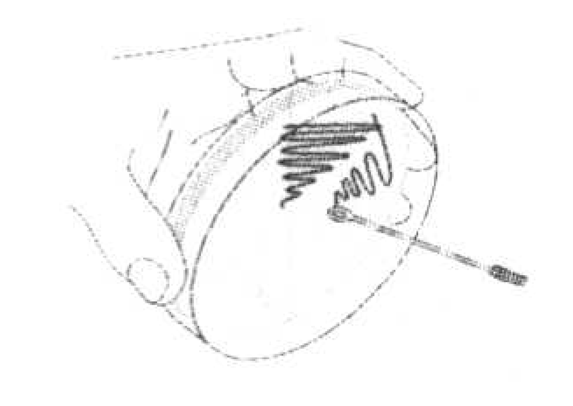
↓

ⓒ 再灼烧铂金丝，冷却。

↓



ⓓ 与前面所画线的一部分交叉划线，以减少菌数。



↓

ⓔ 重复ⓓ步。



↓

ⓕ 37℃倒置培养过夜。

B) 涂布培养

Materials

(1) 涂布棒

(2) 新的平板

(3) 煤气灯或酒精灯

(4) 菌液

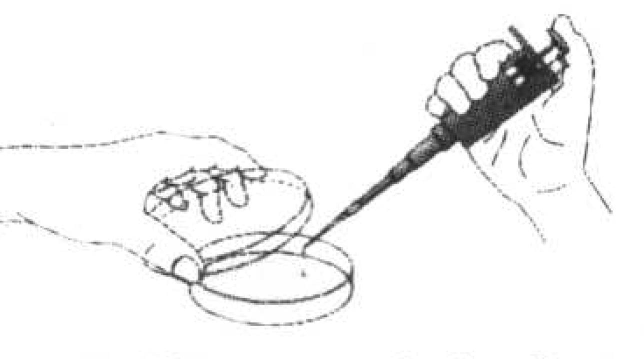
Protocols　　Time：8~16 h(操作 10~15 min)

ⓐ 将平板反转过来，置于盖上，50~55℃干燥 20~30 min[m]。

m. 若不干燥直接涂布，则难干，较费时间。

↓

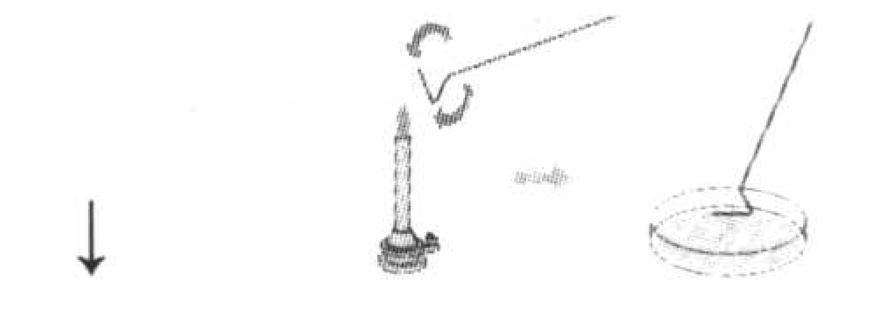
ⓑ 取 100 μL 菌液，滴于平皿上。



↓

ⓒ 用火灼烧涂布棒，然后置于灭菌的培养皿上冷却[n]。

n. 灼烧不是为了灭菌，而是去除残留的乙醇。



↓

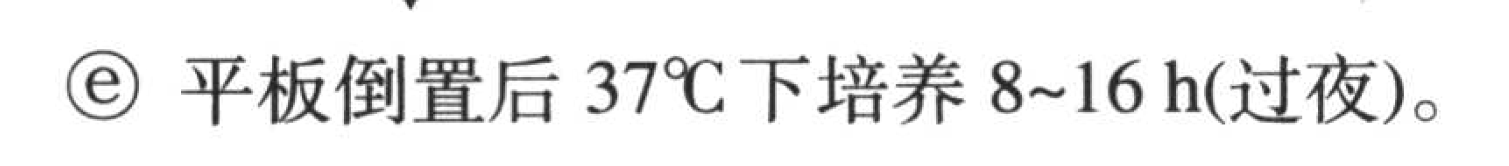
ⓓ 一手持平皿，一手推动涂布棒，使菌液涂布均匀[o]。

o. 如有转动器更好(下图)。转动器一旋转，带动上面的平皿旋转起来，涂布更轻松、均匀。



↓

ⓔ 平板倒置后 37℃下培养 8~16 h(过夜)。



第三节　大肠杆菌菌株保存

1. 平板保存

菌落保存数日至数周，可用平板方式保存。若要保存 1 月以上，宜用甘油管保存。

Materials

(1) 新平板

(2) 圆形标签纸(附录五)

(3) 牙签

(4) 封口膜或胶带

(5) 长有大肠杆菌的初始平皿

Protocols　　Time：8~16 h(操作 10~15 min)

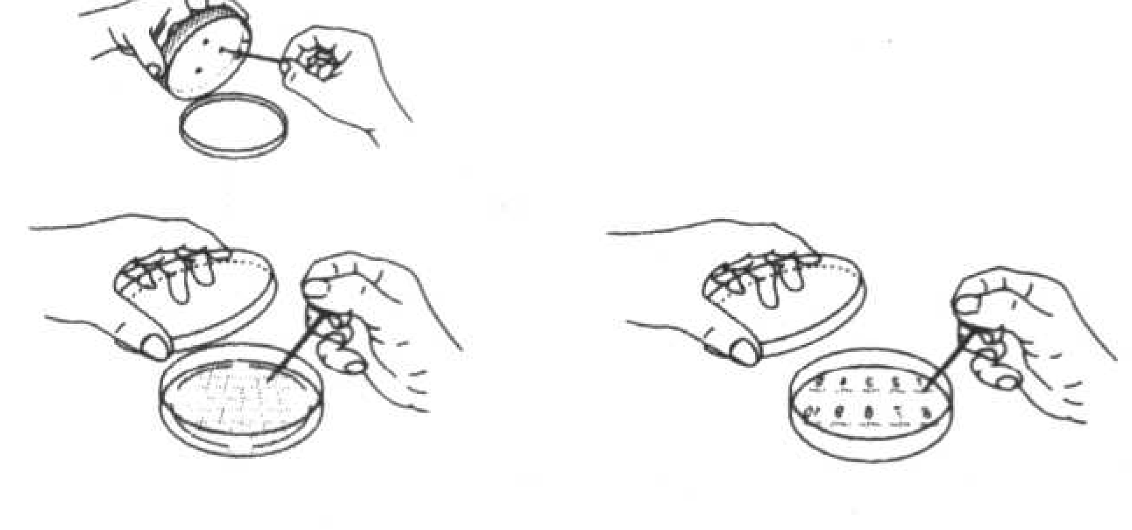
ⓐ 在新平板底部粘贴圆形标签纸，或用记号笔划线[a]。

a. 许多菌落接菌于一个平皿上，能区分。



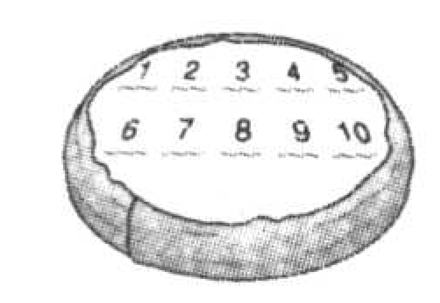
↓

ⓑ 用灭菌牙签挑上一个单菌落，接到平皿上。



↓ O/N

ⓒ 37℃过夜培养后4℃保存。为防止培养基蒸发干燥，可用封口膜封口。



2. 甘油管保存

菌种保存于10%~20%甘油管中，–20℃下可保存2~3年，–70℃可保存更长时间。

Materials

(1) 2 mL 冻存管

(2) 灭菌的80%甘油

(3) 封口膜

(4) 菌液

Protocols　　Time：8~16 h(操作5 min)

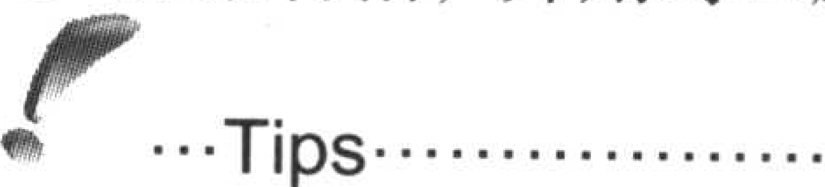
ⓐ 过夜培养2 mL菌液后，取1 mL至冻存管中。

↓

ⓑ 加入200 μL 80%甘油，然后颠倒混匀。

↓

ⓒ 拧紧管帽，并用封口膜封口，保存于–70℃或–20℃冰箱中。



…Tips………………

从甘油冻存管中取菌时，不要使之完全溶解，而是用接种针从其表面刮取少许即可，以减少保存菌的冻融次数，延长保存时间。

3. 穿刺保存

用沾有菌株的接种针插入到高浓度琼脂培养基中，室温可保存1~2年，但不适合突变株及携带质粒的菌株[a]。

a. 穿刺培养基不加抗生素，因此不能保存携带质粒的菌株。

Materials

(1) 含0.7%琼脂的LB培养基(附录一)

(2) 铂金丝

(3) 封口膜

(4) 玻璃瓶

Protocols　　Time：配制穿刺培养基2 h，接种5 min

ⓐ 玻璃瓶内装 2/3 量的培养基，灭菌，室温下冷却凝固。

↓

ⓑ 接种针[b] 火焰灭菌后，刺入培养基中冷却。

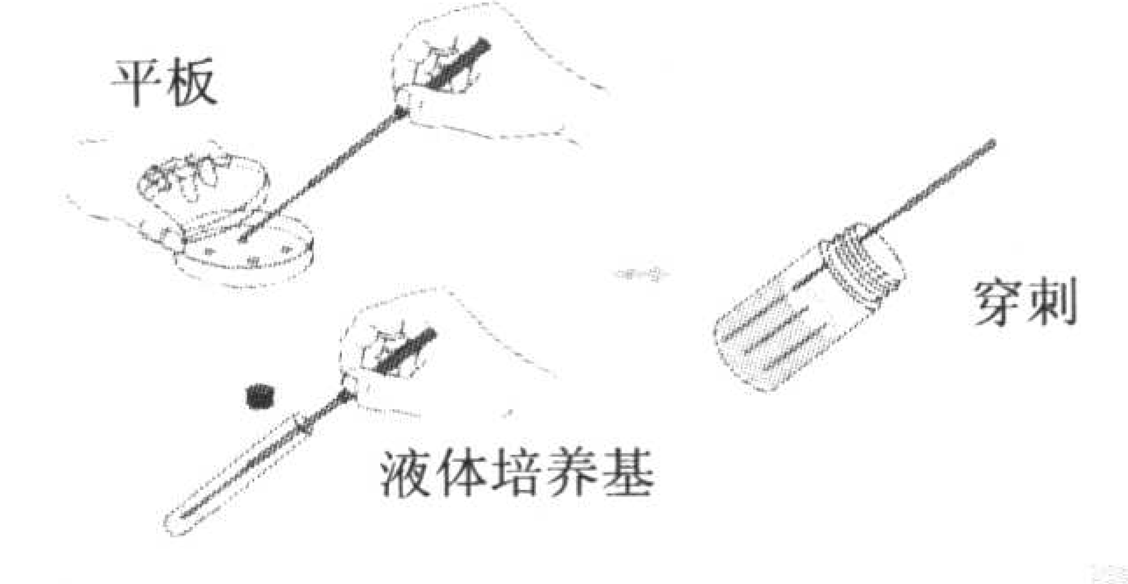
b. 针尖不能是环形结构。

↓

ⓒ 挑取单菌落后刺入培养基中，直到瓶底。

↓

ⓓ 37℃下培养 12~18 h。



↓ O/N

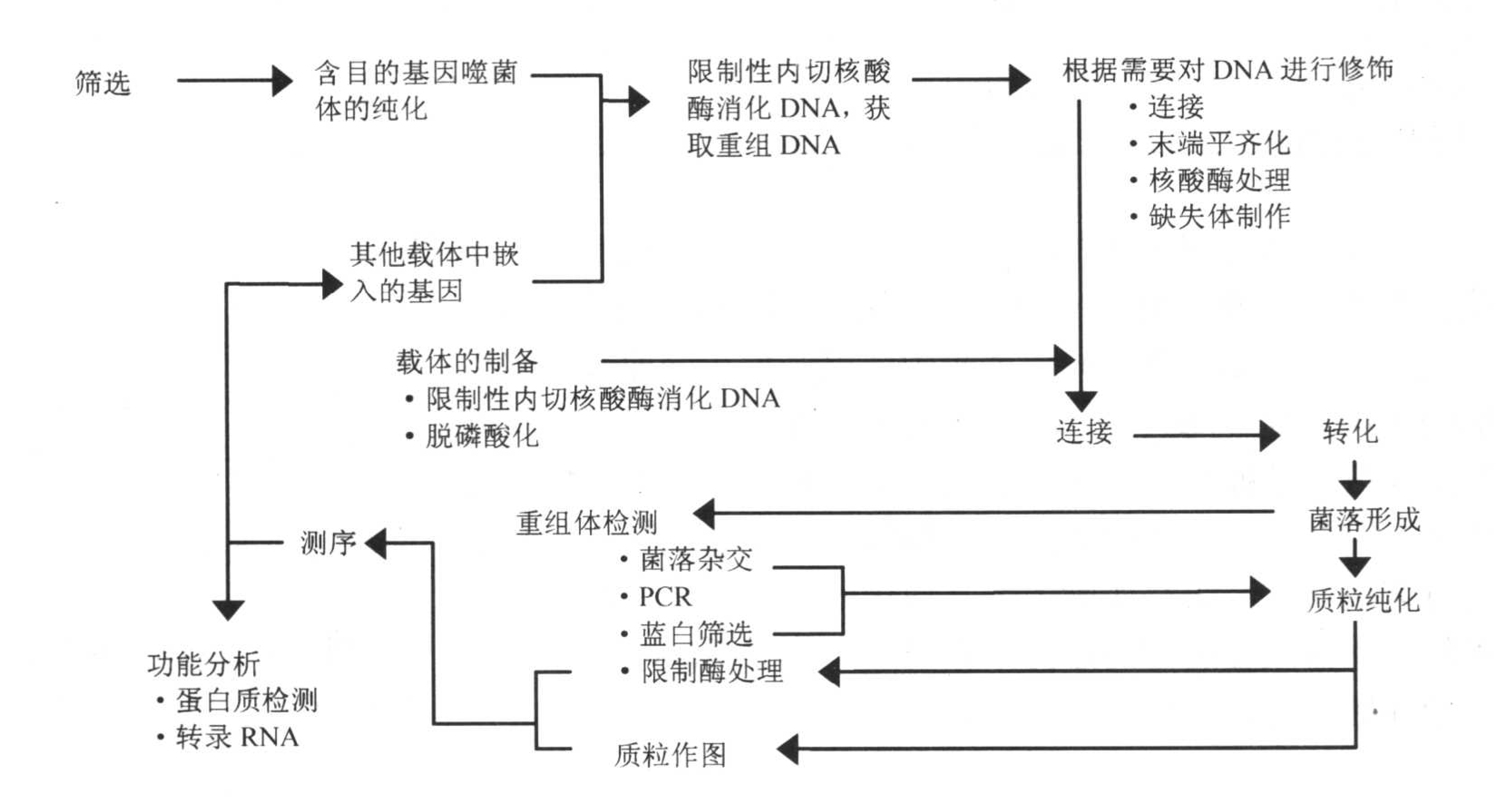
ⓔ 盖紧瓶盖，并用封口膜封口，室温下避光保存[c]。

c. 用石蜡封口密封性更好。

…Questions……………

1. 用于基因克隆的大肠杆菌菌株主要有哪些？它们各自有什么主要特性？
2. 配制氨苄青霉素等抗生素时是否需要灭菌？如何灭菌？
3. 在进行大肠杆菌培养时，何时需要大量培养？何时需要小量培养？
4. 在大肠杆菌培养过程中应注意哪些问题？
5. 当用平板培养大肠杆菌时，培养皿必须倒置，为什么？
6. 大肠杆菌的保存方法主要有哪些？你实验涉及的菌株是否必须用甘油管保存？

第四章　基因操作中的酶学反应



为了研究基因的结构与功能，基因克隆后必须转入合适的载体中。在这个过程中必然使用到各种各样的酶，包括 DNA 切割、连接、修饰等相关酶，这些酶相关的操作过程叫重组，是基因操作中不可缺少的基本技术。

第一节　常用酶的选购与保存

基因重组过程中使用到各种各样的酶(表 4-1)。当初这些酶都由各实验室自己制备，现在能很方便地从商家购买，而且多数实验室常常预备着一些常用的酶，这给实验带来了极大的方便，大大提高了实验进程。在选购酶试剂时，主要以商家提供的酶学信息[a]为前提，因此应认真阅读商家提供的商品指南。

a. 实际上，同一种酶的信息在不同商家间几乎没有差异。因此，更重要的是质量和价格。由于大包装的价格相对便宜，若需要，可考虑选购大包装，但若需要不多，则选择小包装。以半年或一年内用完的量为订购量，在规定期限内用不完，酶则失活。

表 4-1　基因操作中常用的几种核酸酶

核酸酶名称	主要功能
II 型限制性内切核酸酶	在特异性的碱基位点切割 DNA 分子
DNA 连接酶	将两条双链 DNA 分子或片段连接成一个整体
大肠杆菌 DNA 聚合酶 I	通过向 3′ 端逐一添加核苷酸的方式填补双链 DNA 分子上的单链裂口
逆转录酶	以 RNA 分子为模板合成 cDNA 链
多核苷酸激酶	将一个磷酸分子加到多核苷酸链的 5′ OH 末端

续表

核酸酶名称	主要功能
末端转移酶	将同聚物尾巴加到线性双链 DNA 分子或单链 DNA 分子的 3′ OH 末端
外切核酸酶 III	从一条 DNA 链的 3′端切去核苷酸残基
λ 外切核酸酶	自双链 DNA 分子的 5′端移走单核苷酸，从而暴露出延伸的单链 3′端
碱性磷酸酶	从 DNA 分子的 5′端或 3′端或同时从 5′端和 3′端移去末端磷酸
S1 核酸酶	降解 RNA 或单链 DNA 成 5′单核苷酸，也可切割双链核酸分子的单链区
Bal31 核酸酶	具有单链特异内切核酸酶活性，也具有双链特异的外切核酸酶活性
Taq DNA 聚合酶	能在高温(72℃)下以单链 DNA 为模板按 5′→3′方向合成新生互补链

购入的酶应按规定的储存条件(多为−20℃，也有 4℃或 8℃)进行保存，温度上升可能使酶失活。储存酶的冰箱不能选用自动除霜类型 [b]；酶也不能与通常样品保存在同一冰箱中，以避免频繁地开关储存酶的冰箱而导致酶失活。在使用酶的过程中应尽可能在短时间内完成全部操作，避免盛酶的 Eppendorf 管升温而导致酶失活。直接在冰箱内吸取需要的酶量，或在冰上将大包装快速分装成小包装等是实际上经常使用的操作方法。此外，也可使用冰盒或金属制的冰孔来移动盛有酶的 Eppendorf 管，以便在冰箱之外的地方吸取酶液。

b. 停电时怎么办？短时间停电可以不管或加入些冰袋以保持其低温状态。一天以上的停电可在冰箱中加些干冰，但注意不要将干冰放在酶试剂旁，干冰应尽量放置在远离酶的地方，因为干冰易引起酶结冰而使酶失活。

第二节　限制性内切核酸酶

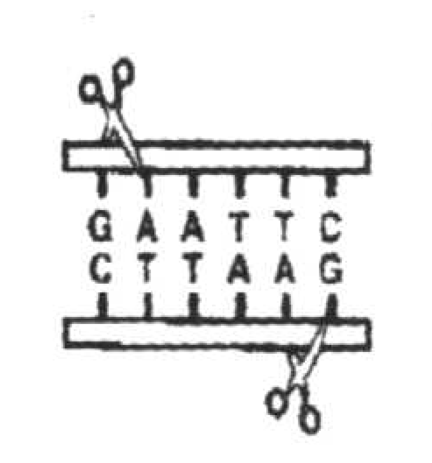


图 4-1　限制性内切核酸酶作用方式

限制性内切核酸酶(restriction enzyme)是一类识别 DNA 上 3~8 个特异核苷酸序列，并产生切割反应的内切核酸酶(endonuclease)的总称。在基因操作中，这些酶作为“剪刀”对 DNA 起剪切作用(图 4-1)，是分子生物学研究中不可缺少的酶之一。

限制性内切核酸酶广泛分布于细菌细胞中，起防御噬菌体感染的作用。与限制性内切核酸酶识别的 DNA 序列相同、产生修饰反应的酶叫修饰酶(主要是甲基化酶) [a]。限制性内切核酸酶对病毒等外来 DNA 起切割反应，但自身基因组 DNA 因修饰酶的修饰作用而不能被切割，这种防御机制叫限制-修饰系统。

a. 甲基化酶也广泛应用于基因操作实验中。

根据酶切反应体系及切割模式的不同，将限制性内切核酸酶分成三大类 [b]。修饰酶活性和限制酶活性分开，反应仅需 Mg^{2+}，有固定识别序列和切割位点，切割位点与识别序列的距离非常接近或完全相同，具有这些特性的限制性内切核酸酶为 II 型限制性内切核酸酶，是基因重组中经常使用的酶之一。

b. I 型酶的反应需要 ATP、S-腺苷甲硫氨酸、Mg^{2+}，其识别序列与切割位点不同，且切割位点不固定(如 *Eco*B、*Eco*K)。III 型酶的反应需要 ATP、Mg^{2+}，其识别序列与切割位点不同，但切割位点固定。

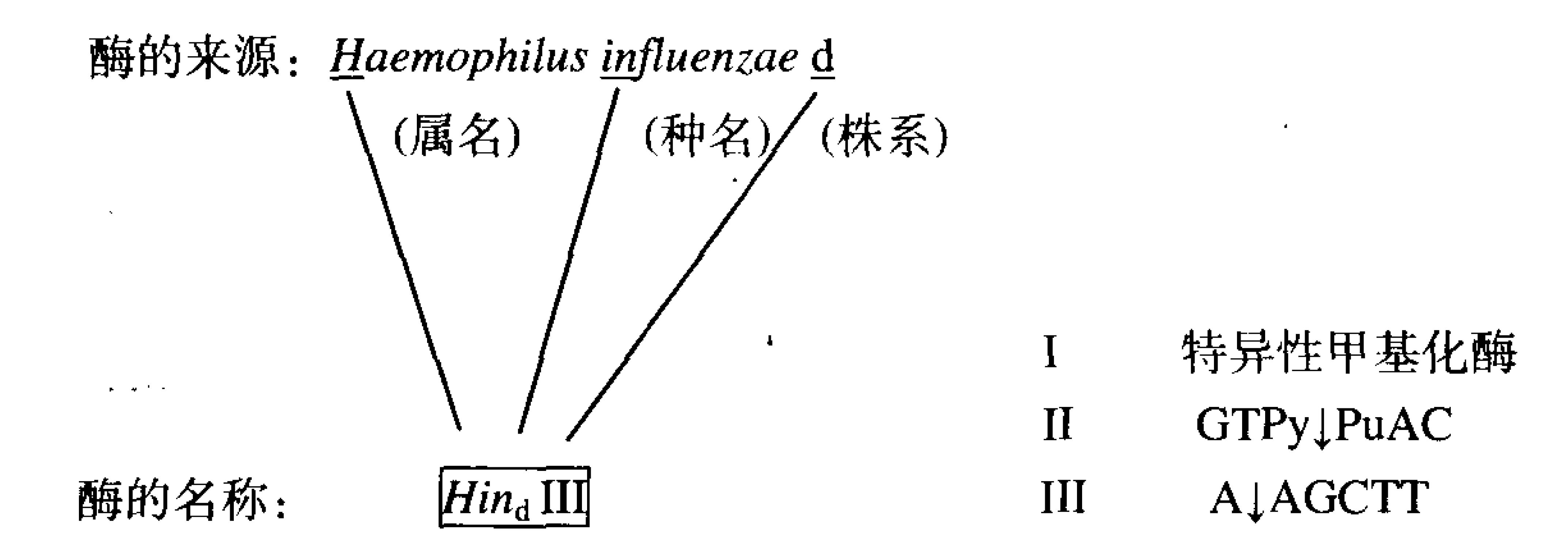


限制性内切核酸酶的命名规则：

(1) 按酶相应来源微生物的学名，取其属名的第一个大写字母和种名的第一、二两个字母(小写)组成酶的基本名称。例如，大肠杆菌(*Escherichia coli*)用 *Eco* 表示，流感嗜血菌(*Haemophilus influenzae*)用 *Hin* 表示。

(2) 用一个写在右下方的标注字母代表菌株或型，如 Eco_k。如果限制与修饰体系在遗传上是由病毒或质粒引起的，则在缩写的寄主菌的种名右下方附加一个标注字母，表示此为染色体外成分，如 Eco_{PI}，Eco_{R1}。

(3) 用大写的罗马数字 I、II、III 和 VI 等来区分存在于同种微生物中具有不同特异性的限制性内切核酸酶。如流感嗜血杆菌中 *Hin*d I、II 和 III 三种酶的命名：



(4) 所有的限制酶，除了总的名称(内切核酸酶 R)外，还带有系统的名称，如限制性内切核酸酶 R. Hin_d III。同样地，修饰酶则在它的系统名称之前加上甲基化酶 M 的名称。相应于限制性内切核酸酶 R. Hin_d III 的流感嗜血菌 Rd 菌株的修饰酶，命名为 M. Hin_d III。

实际应用上，这个命名体系做进一步简化：

(1) 由于下标字母在印刷上很不方便，所以将全部字母写成一行；

(2) 在上下文已经交待得十分清楚、只涉及限制酶的地方，内切核酸酶的名称 R 被省去。

在命名时，不同微生物来源的限制性内切核酸酶出现相同名称时，酶名的第三个字母的取法上可以灵活掌握，以便显示不同的酶名称。

1. 识别序列

II 型限制性内切核酸酶的识别序列长度通常是 4~8 个核苷酸，多数具有对称的回文结构(图 4-2A)，如 *Eco*R I 识别 GAATTC。此外，也有非严谨识别序列的限制性内切核酸酶(图 4-2B)。不同的限制性内切核酸酶可具有相同的识别序列，这些酶叫同裂酶(isoschizomer)(图 4-2C)。另外，限制性内切核酸酶的识别序列越长，按$(1/4)^n$(n 为识别序列长度)公式，其序列存在于 DNA 中的概率就越低。

2. DNA 片段的末端结构

限制性内切核酸酶消化产生的 DNA 末端分为 5′ 黏性末端、平末端、3′ 黏性末端三大类(图 4-3)。末端的 5′ 端为磷酸基团(—P)，3′ 端为羟基基团(—OH)。这些末端结构可能影响其他酶的反应效率，应特别注意。例如，连接酶在黏性末端间的连接效率远高于平末端之间的连接。通常，同一种限制性内切核酸酶切割的 DNA 片段在氢键作用下能互补连接(图 4-2D)，但不同的限制性内切核酸酶切割的 DNA 片段，如有互补的黏性末端，也能相互连接(图 4-2D)。然而同裂酶产生的末端不互补(即异尾酶)则影响以后的操作(图 4-2C)。

A　识别序列(以 *Eco*R Ⅰ、*Not* Ⅰ为例)

*Eco*R Ⅰ切割
5'-NNNG|AATTCNNN-3'
3'-NNNCTTAA|GNNN-5'
识别序列(6 bp)

Not Ⅰ切割
5'-NNNGC|GGCCGCNNN-3'
3'-NNNCGCCGG|CGNNN-5'
识别序列(8 bp)

"N" 为任意碱基

B　多重识别序列(以 *Ava* Ⅰ、*Cpo* Ⅰ为例)

Ava Ⅰ切割
5'-NNNC|PyCGPuGNNN-3'
3'-NNNGPuGCPy|CNNN-5'
Py：C 或 T　Pu：G 或 A

Cpo Ⅰ切割
5'-NNNCG|G(A/T)CCGNNN-3'
3'-NNNGCC(T/A)G|GCNNN-5'
T/A：T 或 A

C　同裂酶

同尾酶关系

*Sau*3A Ⅰ切割
5'-NNN|GATCNNN-3'
3'-NNNCATG|NNN-5'

Mbo Ⅰ切割
5'-NNN|GATC NNN-3'
3'-NNNCTAG|NNN-5'

异尾酶关系

Dpn Ⅰ切割
5'-NNNGA|TC NNN-3'
3'-NNNCT|AG NNN-5'

异尾酶关系

D　同尾酶

Sal Ⅰ切割
5'-NNNG|TCGACNNN-3'
3'-NNNCAGCT|GNNN-5'

Xho Ⅰ切割
5'-NNNC|TCGA GNNN-3'
3'-NNNGAGCT|CNNN-5'

不同的识别序列(不是同裂酶)、但产生相同的黏性末端

图 4-2　限制性内切核酸酶的多种识别序列

A　黏性末端

a　5′黏性末端

5'-NNNG|AATTCNNN-3'
3'-NNNCTTAA|GNNN-5'
*Eco*R Ⅰ →
5'-NNNG^{OH}……………3'
3'-NNNCTTAA$_P$………5'

b　3′黏性末端

5'-NNNCTGCA|GNNN-3'
3'-NNNG|ACGTCNNN-5'
Pst Ⅰ →
5'-NNNCTGCA^{OH}……3'
3'-NNNG$_P$ ……………5'

B　平末端

5'-NNNGG|CCNNN-3'
3'-NNNCC|GGNNN-5'
Hea Ⅲ →
5'-NNNGG^{OH} …………3'
3'-NNNCC$_P$……………5'

图 4-3　切割片段的末端结构

3. 反应条件

通常，从商家购买的限制性内切核酸酶都有合适的反应添加缓冲液，其浓度通常为10×储液，因此，反应体系中应加 1/10 体积量的添加缓冲液对限制性内切核酸酶的反应

是最合适的。不同商家所提供的添加反应缓冲液是不同的，一般准备了 5 种不同的添加缓冲液，足够于所有的限制性内切核酸酶切割反应[a]。不同的限制性内切核酸酶需要不同的盐浓度，因此，应特别注意商家提供的反应添加缓冲液的盐浓度。

此外，反应温度也是重要的反应条件。商家一般提供酶的最适反应温度的信息，大多数酶的最适反应温度是 37℃，但在其他温度下，酶也有一定的活性。

a. 限制性内切核酸酶反应体系中，除了商家提供的 10× 添加缓冲液外，还可能提供 0.1% BSA、0.1% Triton X-100 等稳定剂，以提高酶切效率，这点应特别注意。有些酶，不能使用 5 种基本的添加缓冲液，而应使用专用添加缓冲液。

第三节　限制性内切核酸酶消化 DNA 实验

1. 单个酶的切割反应

以 *Eco*R I 酶切 pBlueScript II SK⁺为例说明酶切反应。

Materials

(1) 37℃恒温水浴锅(或 37℃空气恒温箱)
(2) pBlueScript II SK⁺
(3) 双蒸水
(4) *Eco*R I
(5) 10×H 添加缓冲液

Protocols　　Time：2.5 h

ⓐ 按以下顺序混合试剂[a]：

双蒸水	13 μL
DNA (SK⁺)[b]	4 μL(约 2 μg)[c]
10×H 缓冲液	2 μL
*Eco*R I	1 μL(约 8 U)[d,e]
总体积	20 μL

↓

ⓑ 混匀[f]。

↓

ⓒ 37℃保温 1 h[g]。

↓ O/N

ⓓ 取 1~4 μL 进行琼脂糖凝胶电泳(图 4-4)，以确认是否酶切完全。

↓

ⓔ 剩余的反应液用于以后的实验。

a. 不仅仅是限制性内切核酸酶，许多酶都是昂贵试剂，应注意节约。由于在加样过程中可能出现错误而导致实验失败，因此通常最后添加酶。

b. 本书将 pBlueScript II SK⁺简写成 SK⁺。

c. 反应体系中加入的最大 DNA 量为 200 ng/μL。

d. 酶活力用 U(单位)来定义。1 U 的限制性内切核酸酶定义为 1 h 内使 1 μg DNA 完全切割所需要的酶量。以酶活力为依据计算反应体系中应加入的酶量。但可能因 DNA 结构或纯度问题而导致酶切效率下降，因此反应时间应适当延长，酶量应适当增加，这样可提高实验成功率。

e. 反应体系中加入的酶量不能超过总体积的 1/10。

f. 为防止结冰而使酶失活，不仅限制性内切核酸酶，市售的所有酶试剂中都添加了甘油。因此，使用时应适当离心使其均匀地沉入管底，并用手指轻弹管底或用微量移液器吸打数次，使之混匀。切忌用旋涡混合器等剧烈振荡，否则可能导致酶失活。

g. 反应时间由实验来决定。短时间的保温使用恒温水浴锅来完成，长时间的保温使用空气恒温箱来完成。长时间在恒温水浴锅中进行保温，由于管内外存在温差而导致反应液水分凝结到管盖上，使得反应体系内各组分浓度发生变化，从而影响酶切反应。但空气传热慢，不利于反应体系的温度快速达到预定值，因此，不能使用空气恒温箱来完成短时间(1 h 以下)的酶切反应。

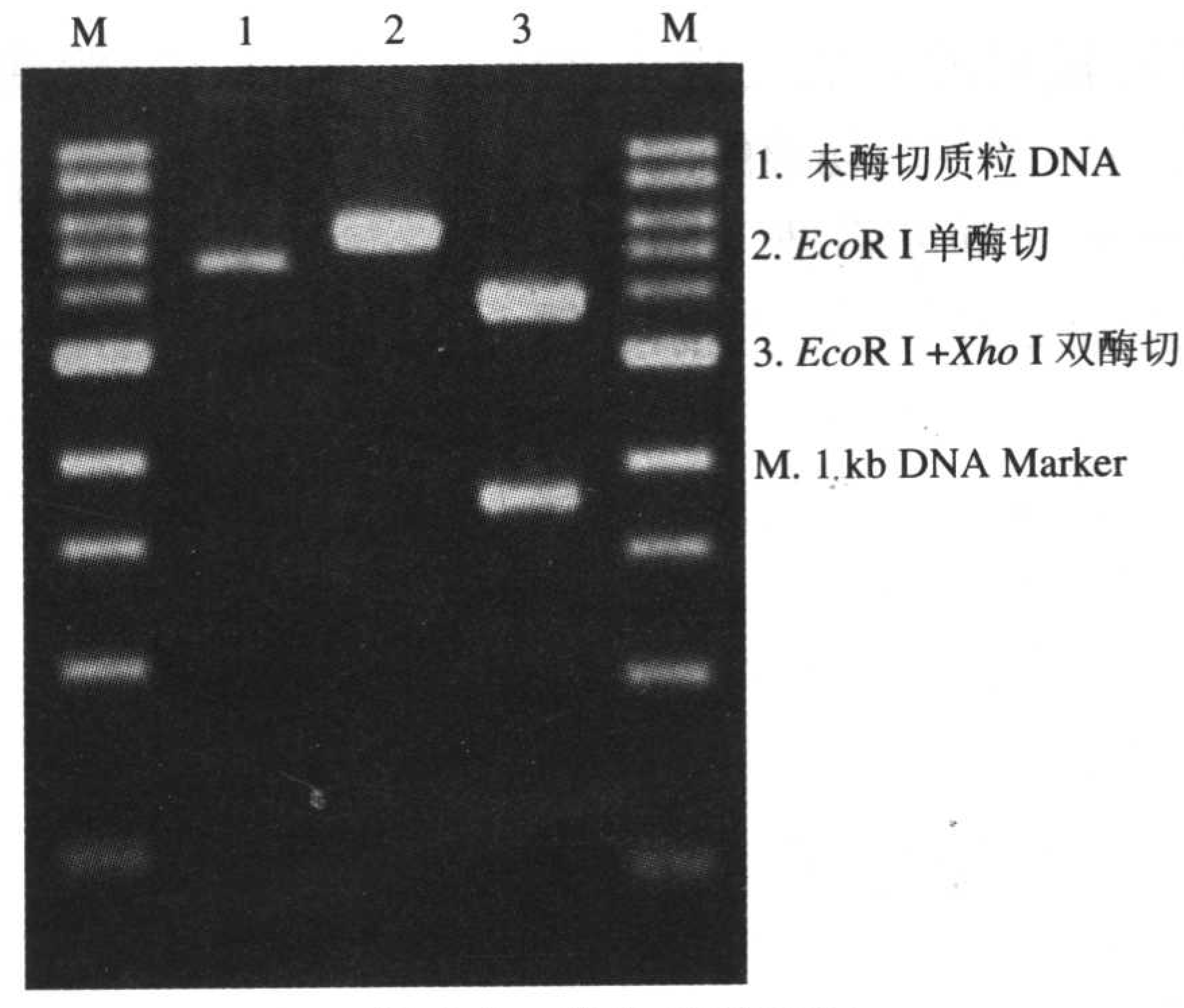


图 4-4　消化 SK^+ DNA

2. 多个酶的切割反应

a. 不使用商家推荐的缓冲液，酶切活性也往往很高。如 TaKaRa 公司推荐的 *Hind* III 添加缓冲液是 10×M，若使用 10×K，其活性则是 10×M 的 2 倍。因此，不同酶组合实验时，添加什么缓冲液最合适，应事先详细调查清楚。若能查找到合适的同一添加缓冲液将大大减少实验操作。

分以下 3 种情况：

(1) 不同的酶使用相同的添加缓冲液[a] → 可同时加入；

(2) 不同的酶使用不同的添加缓冲液→ 第一个酶切完成后，进行酚抽提、乙醇沉淀，再进行第二个酶的消化；

(3) 不同添加缓冲液分属高盐和低盐类型→ 先用低盐酶消化，然后直接添加高盐缓冲液，进行高盐酶切反应。

这里以 *Xho* I、*Eco*R I 共同消化 pBlueScript IISK^+为例说明第(3)种情况的酶切反应。

Materials

(1) 65℃和 37℃恒温水浴锅(或 37℃空气恒温箱)
(2) pBlueScript II SK^+
(3) 双蒸水
(4) *Eco*R I
(5) *Xho* I
(6) 10×H 缓冲液
(7) 10×L 缓冲液

Protocols　　Time：4 h

ⓐ 反应 1：

双蒸水	15 μL
DNA (SK^+)	2 μL(约 1 μg)
10×L 缓冲液	2 μL
*Xho*I	1 μL(约 8 U)
总体积	20 μL

↓

ⓑ 37℃温浴 1 h [b]。

↓ O/N

ⓒ 65℃处理 10 min，以使酶失活。

↓

ⓓ 反应 2：

双蒸水	24 μL
反应 1 溶液	20 μL
10×H 添加缓冲液	5 μL
*Eco*R I	1 μL(约 8 U)
总体积	50 μL

↓

ⓔ 37℃温浴 1 h [b]。

↓

ⓕ 取 1~4 μL 用琼脂糖凝胶电泳来确认是否酶切完全。

↓

ⓖ 剩余的反应液用于以后的实验。

b. 过夜时，使用空气恒温箱或培养箱。

3. 酶切反应的注意事项

1) DNA 纯度

一般而言，纯度高的 DNA(即混入的蛋白质、RNA 或多糖类物质较少)容易被限制性内切核酸酶消化，基因重组实验中的所有酶促反应都有类似共性，因此应尽量提高 DNA 纯度。若 DNA 不能被限制性内切核酸酶切割，应对 DNA 样品进行酚抽提、乙醇沉淀等操作，以提高 DNA 纯度。下列因素影响 DNA 纯度：

(1) DNA 样品中常常杂有 RNA，虽然它的存在不影响酶的反应速度，但 RNA 可和酶蛋白发生非特异性结合而减少酶的有效浓度，使酶解不彻底。另外，RNA 在凝胶电泳中呈现的区带会掩盖该区带范围内的 DNA 片段的呈现，干扰 DNA 片段的观察。

(2) 一般说来，少量蛋白质的污染对 DNA 酶解的影响不大，但如果杂有核酸酶等蛋白质，就会干扰酶切反应，并影响酶解产物。有一类蛋白质叫结合蛋白，它能与 DNA 发生非特异结合，不仅封闭 DNA 上的识别序列而影响酶切反应，而且 DNA 与蛋白质结合物在凝胶电泳上迁移甚慢，从而改变 DNA 片段在电泳图谱中的位置，影响 DNA 片段的定性分析。

(3) 样品中杂有其他 DNA，如制备的质粒 DNA 中含有染色体 DNA 片段等，它们不影响酶解作用，但干扰酶解产物电泳图谱并影响以后的重组连接反应。

(4) DNA 样品中的其他杂质，如 Hg^{2+}、酚、氯仿、乙醇、EDTA、SDS、NaCl 等，这些杂质常常是制备过程中不慎带进的，它们影响酶切速度，甚至改变识别特异性，出现酶的第二活性。

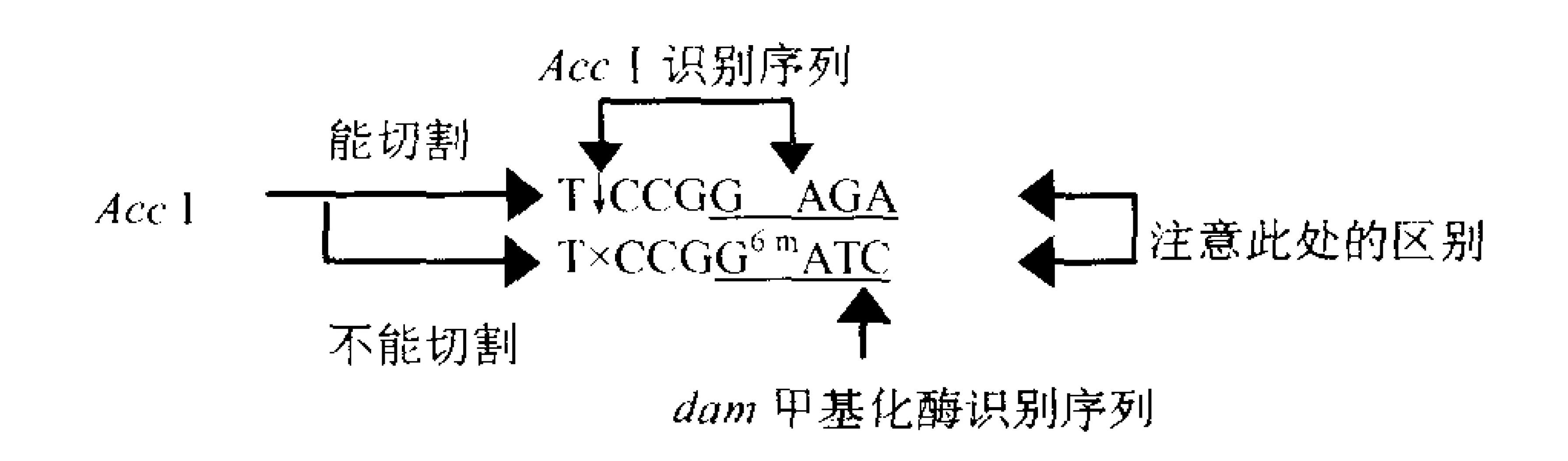
2) DNA 甲基化

限制性内切核酸酶的识别序列若被修饰酶产生了修饰反应(如甲基化酶的甲基化反应)，则该 DNA 不能被限制酶再切割。甲基化酶是大多数大肠杆菌菌株中都存在的酶系之一，有 *dam* 甲基化酶和 *dcm* 甲基化酶两大类。*dam* 甲基酶在 5′ GATC 3′ 的 A 上甲基化，*dcm* 甲基化酶在 5′ CCAGG 3′ 或 5′ CCTGG 3′ 的 C 上甲基化。表 4-2 列举了受甲基化影响的一些限制性内切核酸酶及其影响程度。若出现甲基化影响，则应使用甲基化酶缺损菌株(dcm^-或 dam^-)，或使用不受甲基化酶影响的限制性内切核酸酶，如 *Mbo*I 和 *Sau*3A 是同裂酶，因 *Mbo*I 受甲基化影响程度大，则宜使用几乎不受甲基化酶影响的 *Sau*3A。

表 4-2　受甲基化影响的限制性内切核酸酶

限制性内切核酸酶	限制性内切核酸酶	识别序列及甲基化位点	影响程度
	Acc I	T ↓ CCGG^{6m}A	1/16
	Cla I	AT ↓ CG^{6m}AT	1/4
	Fba I	T ↓ GATC^{6m}A	1
	Mbo I	↓ G^{6m}ATC	1
受 *dam* 甲基化酶影响的限制性内切核酸酶	*Mbo* II	GAAG^{6m}ANNNNNNNN ↓	1/16
	Mfl I	(A/G) ↓ G^{6m}ATC(T/C)	1
	Nru I	TCG ↓ CG^{6m}A	1/16
	*Tth*HB8 I	TCG^{6m}A	1/16
	Xba I	T ↓ CTAG^{6m}A	1/16
受 *dcm* 甲基化酶影响的限制性内切核酸酶	*Apa* I	GGGCC ↓ ^{5m}C	1/64
	Ava I	G ↓ G(A/T)C^{5m}C	1/64
	Bal I	TGG ↓ C^{5m}CA	1/16
	*Cfr*13 I	G ↓ GNC^{5m}C	1/64
	Eae I	(T/C) ↓ GGC^{5m}C(A/G)	1/32
	*Eco*O109 I	(A/G)G ↓ GNC^{5m}C(T/C)	1/32
	Sfi I	GGC^{5m}CNNNN ↓ NGGCC	1/64
	Stu I	AGG ↓ C^{5m}CT	1/16
	*Van*91 I	C^{5m}CANNNN ↓ NTGG	1/16
	*Vpa*KIIB I	G ↓ G(A/T)C^{5m}C	1/64
几乎不受 *dam* 甲基化酶影响的限制性内切核酸酶	*Bam*H I	G ↓ G^{6m}ATCC	0
	Bgl II	A ↓ G^{6m}ATCT	0
	Pvu II	CG^{6m}AT ↓ CG	0
	*Sau*3A I	↓ G^{6m}ATC	0
几乎不受 *dcm* 甲基化酶影响的限制性内切核酸酶	*Mvu* I	C^{5m}C ↓ (A/T)GG	0

注：↓：切割位点；^{6m}A, ^{5m}C：甲基化碱基。影响程度为 1 的酶多不能有效切割大肠杆菌 DNA；影响程度为 0~1 的限制酶是否能有效切割取决于识别序列后的碱基序列。例如，



3) 星号活力

又称第二活力，是指改变了酶切反应条件后特异序列识别特性降低的一种现象。由于识别特异性降低，可能对原识别序列相似的序列也产生切割反应。如 *Eco*R I 的典型识别序列为 GAATTC，条件改变后，其识别序列由原来的六核苷酸降为四核苷酸 AATT。高浓度甘油、高 pH、低离子强度、*β*-巯基乙醇、DMSO、Mn^{2+}等的存在可能导致酶产生星号活力。商家提供的酶一般存放在 50%甘油溶液中。若酶量占反应体系的 1/10 以上，将可能导致星号活力，这点应特别注意。小的反应体系若长时间在恒温水浴锅中进行酶切反应，因 Eppendorf 管的内外温差将导致水分蒸发，蒸汽凝结在盖子上而使反应体积缩小非常明显，将改变反应体系的组成，而容易产生星号活力。因此，长时间进行酶切反应，宜使用空气恒温箱为保温设备，可避免水分蒸发和凝结。图 4-5 表示 *Eco*R I 产生星号活力的条件。

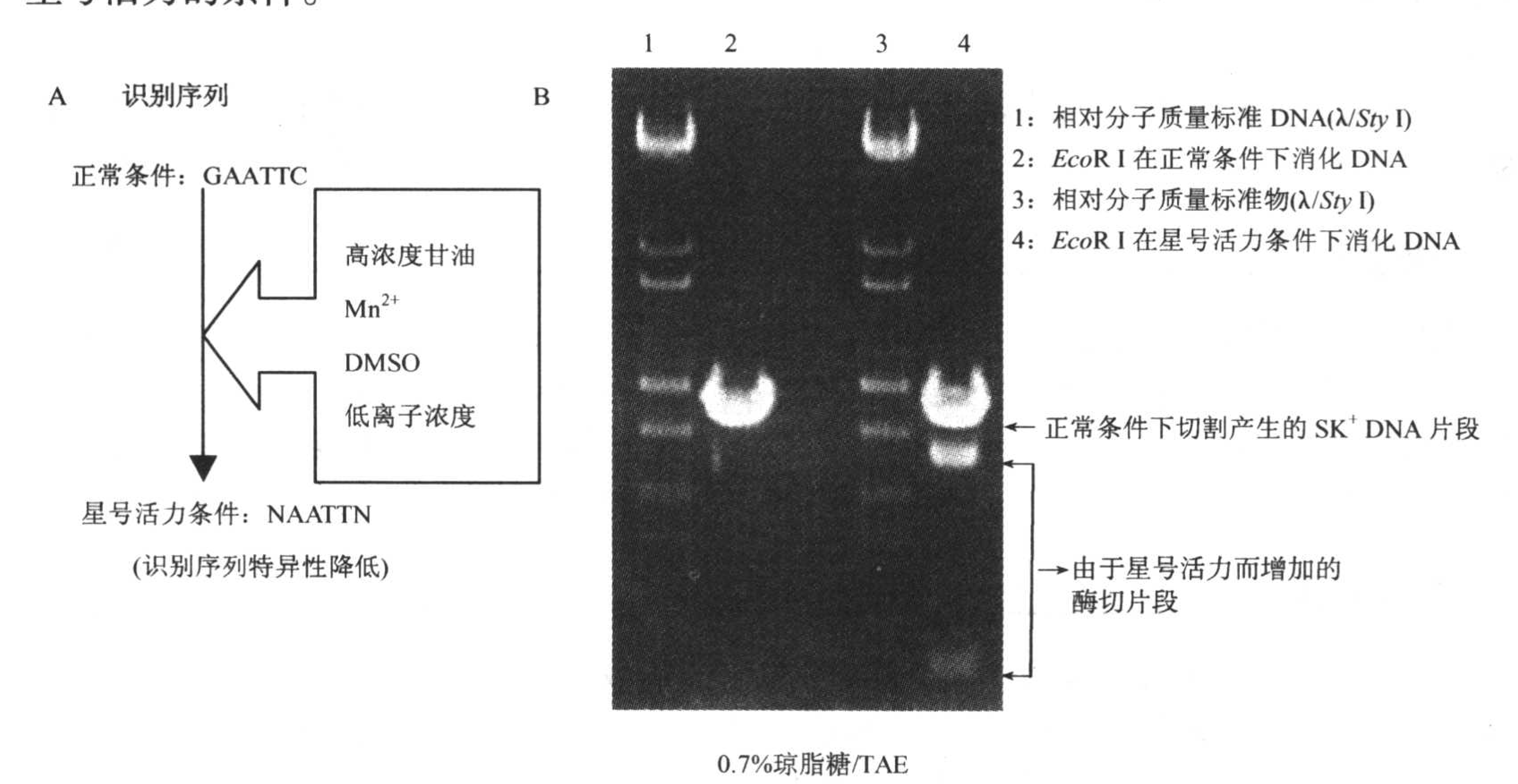


图 4-5 *Eco*R I 的星号活力

A. *Eco*R I 出现星号活力的条件及识别序列的变化；B. *Eco*R I 出现星号活力而改变 DNA 片段数

4. 终止限制性内切核酸酶反应的方法

(1) 加 EDTA 以螯合 Mg^{2+}，使酶失去辅助因子而终止酶切反应；

(2) 65℃下保温 5~10 min 而使酶失活。但有些酶在此温度下仍有活性，这种酶就不能用高温失活方法来终止酶切反应；

(3) 加 SDS 至终浓度 0.1%或加尿素至 0.5 mol/L，使酶蛋白解聚变性；

(4) 用等体积酚抽提酶解产物，这种方法使酶活性丧失最彻底，灭活后的样品用乙醇沉淀法回收 DNA。

选择哪种灭酶活方法，应根据实验要求来选取。若酶解产物还需继续进行其他酶反应，如连接反应，可选用(2)或(4)的方法；只需要用琼脂糖凝胶电泳来鉴定产物或分离目

的片段，可用方法(1)或(3)。最常用的终止反应液组分为：50%(*V*/*V*)甘油、100 mmol/L Na_2EDTA (pH8.0)、1% SDS 和 0.02%溴酚蓝。取酶反应体系 1/5~1/10 体积的终止反应液与酶反应产物混合，即可终止反应。这样处理的样品可直接加入到凝胶中进行电泳。

第四节　DNA 作图

筛选到目的基因或用 PCR 扩增到目的片段后，应先做什么呢？通常应首先确定该 DNA 有哪些限制性内切核酸酶识别位点，这个过程叫 DNA 作图。完成 DNA 作图后，就可在片段内部进行酶切并插入到载体 DNA 上完成 DNA 重组操作，进而可方便地进行序列测定或构建突变体。

用哪些限制性内切核酸酶进行 DNA 作图呢？一般而言选择：①实验室常用的限制性内切核酸酶；②克隆载体的多克隆位点(multi-cloning site，MCS)存在的限制性内切核酸酶。

以重组到 KS^-/*Eco*R I 位点的 2~4 kb (基因 X) DNA 作图[a] 为例。

a. 本书将 pBlueScript II KS^- 简写为 KS^-。

Materials

除电泳所需试剂及装置外，还应准备以下器械和试剂：

(1) 37℃恒温水浴锅(或 37℃空气恒温箱)
(2) 双蒸水
(3) 作图用的质粒 DNA
(4) 10×BSA 添加缓冲液
(5) 限制性内切核酸酶及相应的 10×添加缓冲液

Protocols　　Time：3 h

在 KS^-的 MCS 上有如下 15 种限制性内切核酸酶的单一切点。分别取 1 μL(约 0.4 μg)DNA 加入到 20 μL 体系中进行酶切消化。当然，每个消化反应分别在不同的 Eppendorf 管中进行。括号内字母为添加反应缓冲液。

Apa I(L)	*Bam*H I(K)	*Bst*X I(H)	*Cla* I(M)	*Eco*R I(H)	*Eco*R V(H)
Hind III(M)	*Kpn* I(L)	*Pst* I (H)	*Sac* I(L)	*Sal* I(H)	
Sma I(T+BSA)		*Spe* I(M)	*Xba* I(T+BSA)		*Xho* I(K)

ⓐ 反应体系：

双蒸水	16 μL[b]
DNA	1 μL(约 0.4 μg)
10×添加缓冲液	2 μL
各限制性内切核酸酶	1 μL
总体积	20 μL

↓

ⓑ 37℃温浴 1 h[c]。

↓ O/N

ⓒ 取 10 μL 进行琼脂糖凝胶电泳。

b. 若需添加 2 μL BSA 于反应体系，则加水 14 μL。

c. 过夜酶切时，应使用恒温箱。

↓

ⓓ 根据电泳结果，确定片段数及片段长度(表 4-3)。

↓

ⓔ 作图：在以下结果基础上，边作图边推测切割位点(图 4-6)。

表 4-3　各种限制性内切核酸酶对 X/KS⁻- *Eco*R Ⅰ重组体消化产生的片段数和片段长度

酶	片段数	片段长度/kb		
Apa I	2[b]	4.8	0.6	
*Bam*H I	3[c]	3.5	1.3	0.6
*Bst*X I	3	3.7	0.9	0.8
Cla I	1[a]	5.4		
*Eco*R I	2	3.0	2.4	
*Eco*R V	1	5.4		
Hind III	3	3.4	1.2	0.9
Kpn I	2	4.4	0.7	
Pst I	3	3.5	1.3	0.6
Sac I	2	3.4	2.0	
Sal I	1	5.4		
Sma I	2	4.6	0.8	
Spe I	1	5.4		
Xba I	1	5.4		
Xho I	1	5.4		

注：a. 片段数=1 → 仅切割 MCS，在基因 X 上无切点。

b. 片段数=2 → MCS 和基因 X 上各有一切点，根据片段长度推测 X 内的切割位点。

c. 片段数=3 或更多→基因 X 上有 2 个以上的切割位点，此时难以确定具体切割位点。但是，若很好地将两种限制性内切核酸酶组合起来，也能推测出切割位点，如将 b 和 c 两类型组合起来。

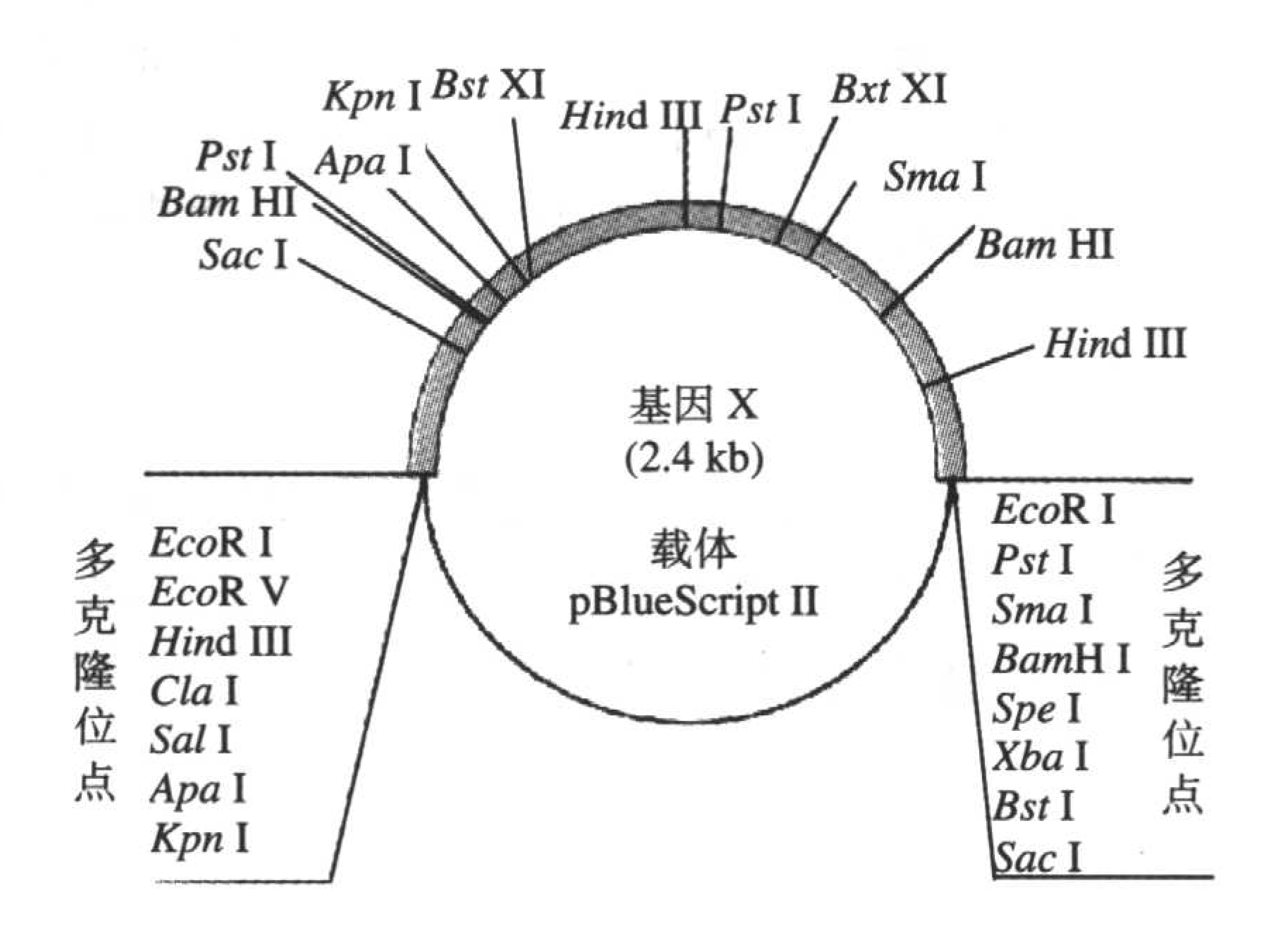


图 4-6　作图结果

有下画线的酶为单切点酶

第五节　连　接　酶

限制性内切核酸酶的作用类似于“剪刀”，那么在 DNA 或 RNA 之间起“糨糊”作

用的酶为连接酶(ligase)。在重组中，双链 DNA 片段之间的连接用 DNA 连接酶，单链 DNA 之间或单链 RNA 之间的连接用 RNA 连接酶。

DNA 连接酶能在双链 DNA 的 5′ 磷酸末端与 3′ 羟基末端之间形成磷酸二酯键。大肠杆菌噬菌体 T4 编码的 T4 DNA 连接酶及大肠杆菌染色体 DNA 编码的 *E. coli* DNA 连接酶是常用的 DNA 连接酶。由于 *E.coli* DNA 连接酶对平末端 DNA 连接效率非常低，因此 T4 DNA 连接酶是更常用的 DNA 连接酶。T4 DNA 连接酶主要用于：①待重组 DNA 片段插入到载体 DNA；②在 DNA 片段上加接头或衔接子。

a. 提高连接效率的几点建议：
(1) 体系中加 1%~7.5% PEG 6000~PEG 8000；
(2) 降低连接温度，如 4~8℃；
(3) 延长限制酶灭活时间或进行 DNA 纯化。

1. T4 DNA 连接酶[a]

1) 5′端磷酸化

DNA 连接酶是在双链 DNA 的 5′ 磷酸基团及 3′ 羟基间进行酶促反应。因此，待连接 DNA 的 5′ 端必须磷酸化。若 5′ 磷酸基团脱落成 5′ 羟基，则不能进行连接反应。

2) 待连接 DNA 末端结构

待连接 DNA 末端若是黏性末端，因存在碱基间的氢键作用而容易形成配对，因此，它们之间很容易形成磷酸二酯键而完成连接反应(图 4-7B)。若是平末端，它们之间不存在碱基间的氢键作用而难于形成配对，但 T4 DNA 连接酶也能帮助它们形成磷酸二酯键而完成连接反应(图 4-7A)，尽管连接效率相对黏性末端而言低很多。此外，末端碱基的组成也影响连接效率，有以下趋势：

黏性末端：*Hind* III >*Pst* I>*Eco*R I >*Bam*H I >*Sal* I
(*Hind* III 位点是 *Sal* I 的 10~40 倍)

平齐末端[b]：*Hae* III >*Alu* I >*Hind* II >*Sam* I
(*Hae* III 位点是 *Sam* I 的 5~10 倍)

b. 在采用大量 T4 DNA 连接酶并配以 5~10 U T4 RNA 连接酶时，可显著提高平端连接效率。

2. 连接试剂盒

为了完成连接反应，购买连接酶、自己设计连接体系是可以的，但操作繁琐、费时、连接效率不高。如果经费允许，可购买连接性能稳定、连接效率高、仅需要几十分钟就可实现连接的试剂盒。这里介绍几种常用的连接试剂盒，详细操作参照商家的使用手册。

1) DNA 连接试剂盒

该试剂盒(TaKaRa 公司，50 次装)将连接缓冲液、ATP、连接酶等合理地组合在同一溶液中，因此，只要添加待连接 DNA 即能实现连接。全部连接过程仅需要 30 min。

2) pGEM-T 载体系统 I

该试剂盒(Promega 公司)用于 PCR 产物的重组。PCR 产物 3′ 端因 DNA 聚合酶的碱基非依赖性可能增加一个多余的 A，成为黏性片段，可直接连接到该试剂盒提供的 3′ 端

突出 T 尾的 TA 载体上。

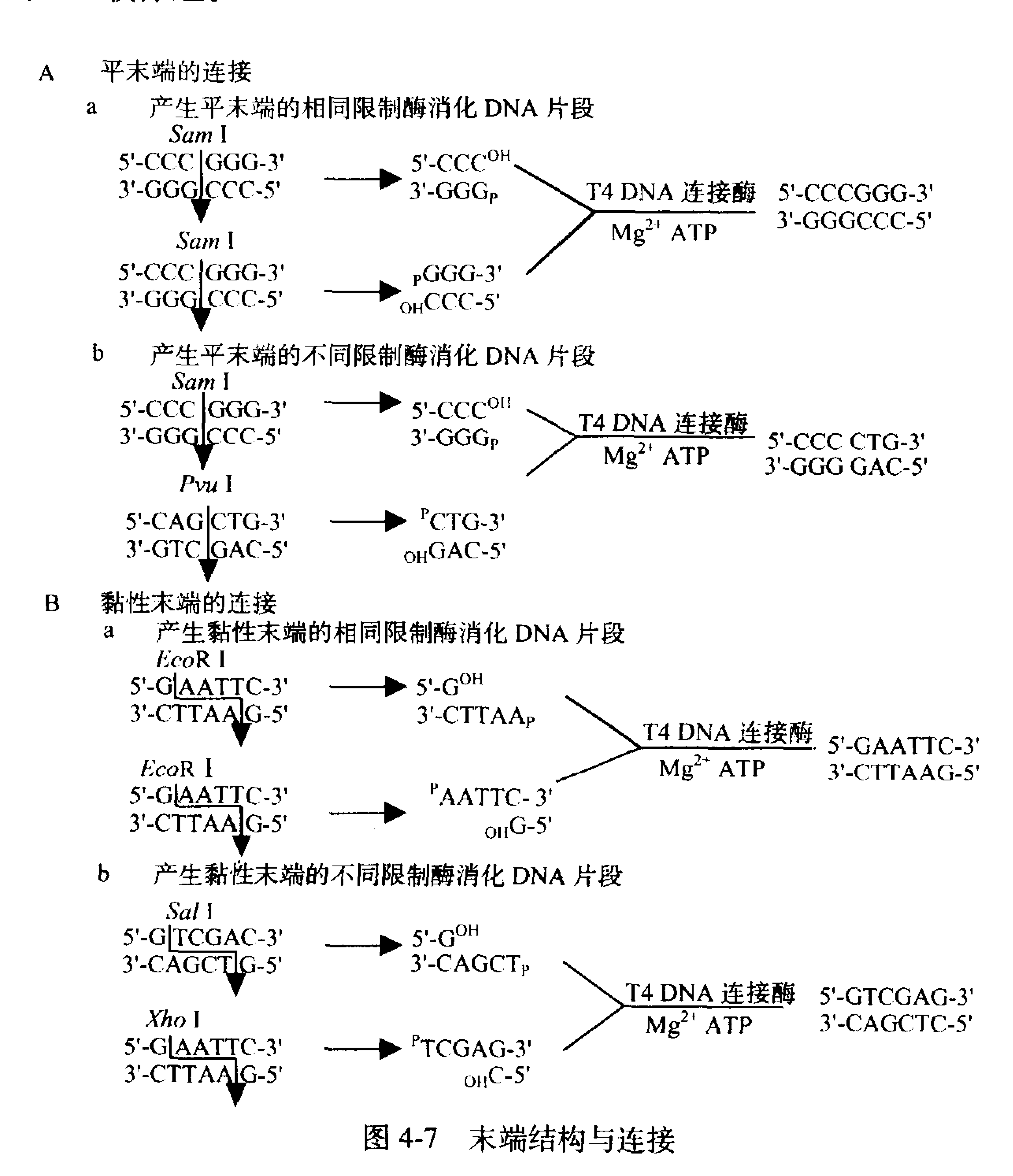


图 4-7 末端结构与连接

第六节 其他核酸酶

1. 碱性磷酸酶

碱性磷酸酶能够脱掉 DNA、RNA 或核苷酸中的磷酸基团，使 DNA(或 RNA)片段的 5′ 磷酸成为 5′ 羟基基团(图 4-8)。该酶最适 pH 为碱性，故得此名。市场销售的碱性磷酸酶有多种，常用的仅 2 种：大肠杆菌碱性磷酸酶(bacterial alkaline phosphatase，BAP)和小牛肠碱性磷酸酶(calf intestine alkaline phosphatase，CIAP)，二者除最适温度和耐热性外，其他特性几乎相同。BAP 最适温度为 60~65℃，CIAP 为 37℃。BAP 非常稳定，100℃也不失活；CIAP 在 65℃下保温 30 min 几乎完全失去活性。由于它们耐热性都较高，如果残留微量的酶将严重影响以后的连接反应。因此，使用碱性磷酸酶后，必须进行 2 次以上的酚抽提以彻底清除掉残留的碱性磷酸酶。

应用：①为防止载体 DNA 自连而进行的脱磷酸反应；②5′端标记前的预处理。

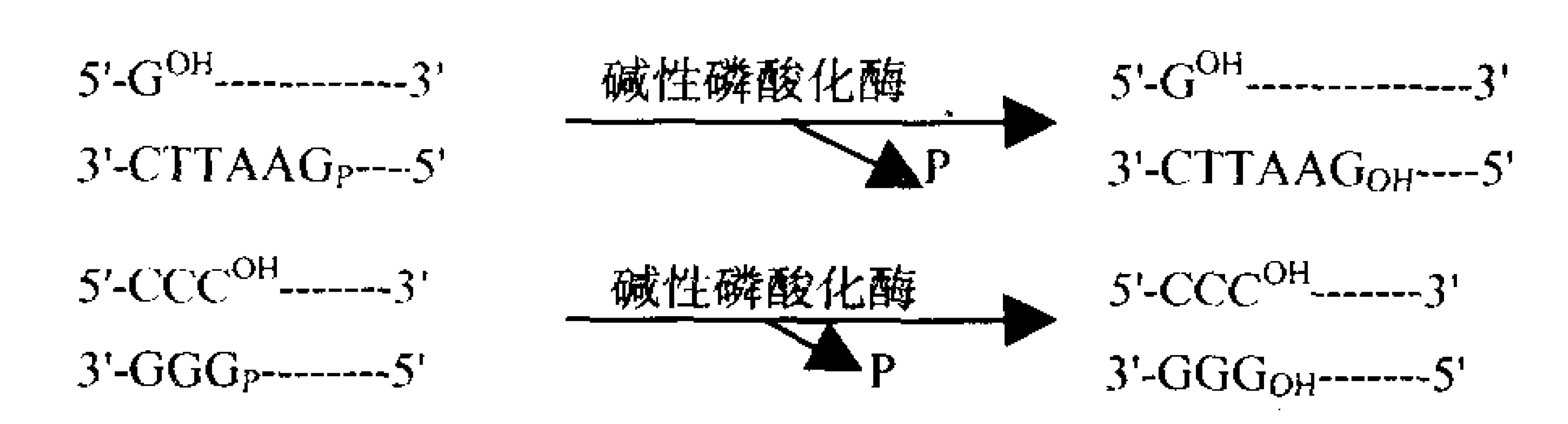


图 4-8　DNA 5′ 端的脱磷酸化反应

2. DNA 甲基化酶

DNA 甲基化酶(DNA methylase)对 DNA 起修饰作用，其在识别的特异序列后的 A 或 C 上进行甲基化，这将使其原限制性内切核酸酶或相关的限制性修饰酶不再识别而不能产生酶切反应。若某一碱基发生了甲基化，则该位点不能再被甲基化。

A. *Bam*H I 甲基化酶识别碱基(图 4-9)

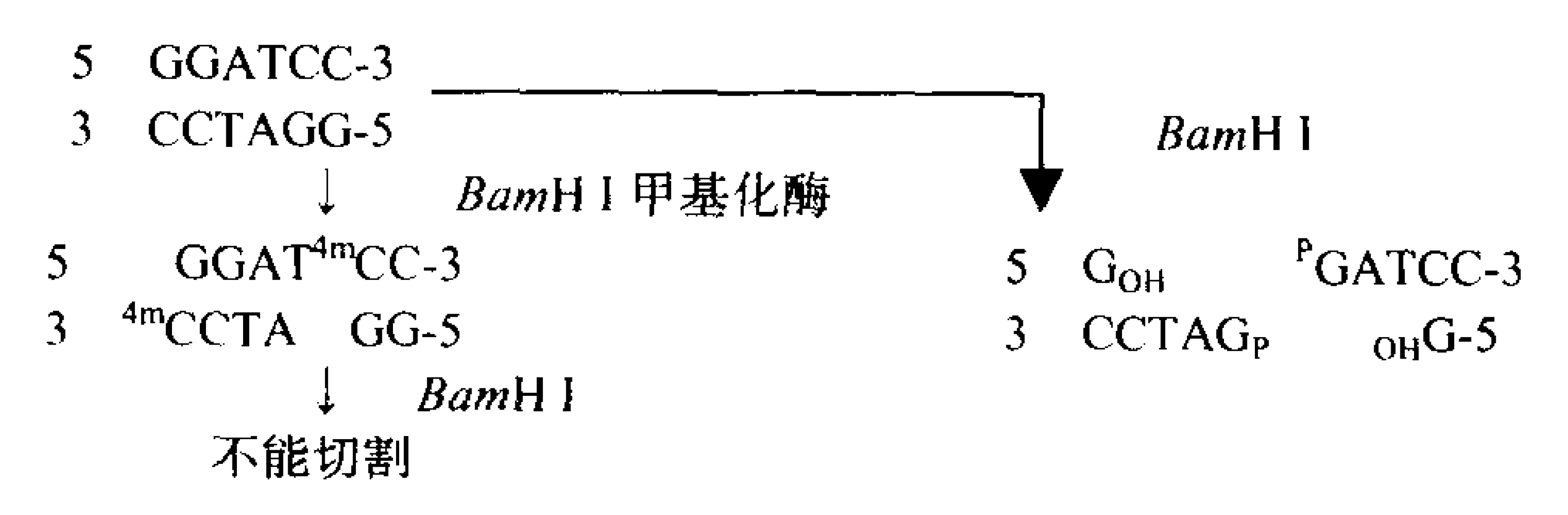


图 4-9　*Bam*H I 及其甲基化酶的识别特性

B. 对 *Bam*H I 甲基化酶甲基化反应的影响(表 4-4)

表 4-4　*Bam*H I 甲基化酶甲基化反应的影响

甲基化处理前识别序列	*Bam*H I 甲基化酶处理与否	处理后	*Bam*H I 是否可切割
GGATCC(非甲基化)	○	GGAT^{4m}CC	×
GG^{6m}ATCC(A 甲基化)[a]	○	GG^{6m}AT^{4m} CC	○
GGATC^{5m}C(C 甲基化)[b]	×	GGATC^{5m}C(非甲基化)	○

注：^{6m}A、^{5m}C、^{4m} C 为甲基化碱基。

a. 利用 *dam* 甲基化酶；

b. 利用 *dcm* 甲基化酶。

a 和 b：应注意，这些位点的甲基化不影响 *Bam*H I 消化。

C. *Bam*H I 甲基化酶对一些限制性内切核酸酶反应的影响(表 4-5)

表 4-5　*Bam*H I 甲基化酶对一些限制性内切核酸酶反应的影响

酶	识别序列	不能切割的序列	影响程度
*Bam*H I	G↓GATCC	GGAT^{4m}CC	1
Mfl I	Pu↓GATCPy	GGAT^{4m}CC	1/2
Mva I	CC↓WGG	GGAT^{4m}CCWGG	1/256
Nco I	C↓CATGG	GGAT^{4m}CCATGG	1/256
*Sau*3A I	↓GACT	GGAT^{4m}CC	1/16

注：Pu(嘌呤类碱基)：G 或 A。Py(嘧啶类碱基)：C 或 T。W：A 或 T。^{4m}C：甲基化碱基。
↓：切断部位。影响程度：为 *Bam*H I 甲基化酶处理后 DNA 不能被切割的程度。

应用：① 在重组 DNA 过程中使用了接头，但插入 DNA 中也存在接头所包含的限

制性内切核酸酶识别序列。此时，先用甲基化酶将插入 DNA 甲基化，再与接头连接起来，然后进行限制性内切核酸酶消化。插入 DNA 因已甲基化不再被限制性内切核酸酶识别而被保护起来，接头部分则未被甲基化而有效地被限制性内切核酸酶识别而进行酶切反应，进而实现重组目的。② 某 DNA 含有多个酶切位点，但有些位点不希望被切割。此时，可用甲基化酶对不希望被切割的序列保护起来。表 4-5 中的 *Nco* I 识别的上游序列若改为 GGAT，则因甲基化而不能被 *Nco* I 酶切，其他位点则可被 *Nco* I 有效切割。

3. Klenow 片段

用枯草芽孢杆菌蛋白酶处理大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 全酶，将分解出 34 kDa(N 端)和 68 kDa (C 端)的两片段，大片段即为 Klenow 片段(Klenow fragment)。DNA 聚合酶 I 具有 5′→3′ 聚合酶活性、5′→3′ 外切核酸酶活性和 3′→5′ 外切核酸酶活性。但 Klenow 片段缺少了 5′→3′ 外切核酸酶活性(表 4-6)。

表 4-6 各种聚合酶的活性

	大肠杆菌 DNA 聚合酶	Klenow 片段	噬菌体 T4 聚合酶
5′→3′ DNA 聚合酶活性	+	+	+
双链 DNA5′→3′ 外切核酸酶活性	+	−	−
双链 DNA3′→5′ 外切核酸酶活性	+	+	+
单链 DNA3′→5′ 外切核酸酶活性	+	+	+

市售的 Klenow 片段是从克隆了不能编码 N 端氨基酸序列的 DNA 聚合酶 I 基因的工程菌株中分离纯化的。基因操作中，利用其 5′→3′ 聚合酶活性使 5′ 黏性末端实现平齐。

应用：① 双链 DNA 5′ 黏性末端平齐化处理；②末端标记；③用随机引物法标记 DNA 末端；④用寡聚体法体外构建突变体；⑤用 Sanger 法测序；⑥单链 cDNA 合成双链 cDNA。

4. 大肠杆菌噬菌体 T4 聚合酶

大肠杆菌噬菌体 T4 聚合酶(bacteriophage T4 polymerase)的特性与 Klenow 片段几乎相同(表 4-4)。但 3′→5′外切核酸酶活性是 Klenow 片段的 200 倍以上。因此，在基因操作中用于双链 DNA 3′ 黏性末端的消化而使 DNA 平齐。此外，利用其 5′→3′ DNA 聚合酶活性和 3′→5′ 外切核酸酶活性，可将 3′ 或 5′ 黏性突出末端混合的 DNA 分子末端平齐。T4 聚合酶由于具有较强的 3′→5′ 外切核酸酶活性，因此利用其 5′→3′ 聚合酶活性时应注意在低温和高浓度 dNTP 存在下进行。

应用：①双链 DNA 5′ 黏性末端平齐化处理；②双链 DNA 3′ 黏性末端平齐化处理；③末端标记；④引物延伸法开展的转录起始点的分析。

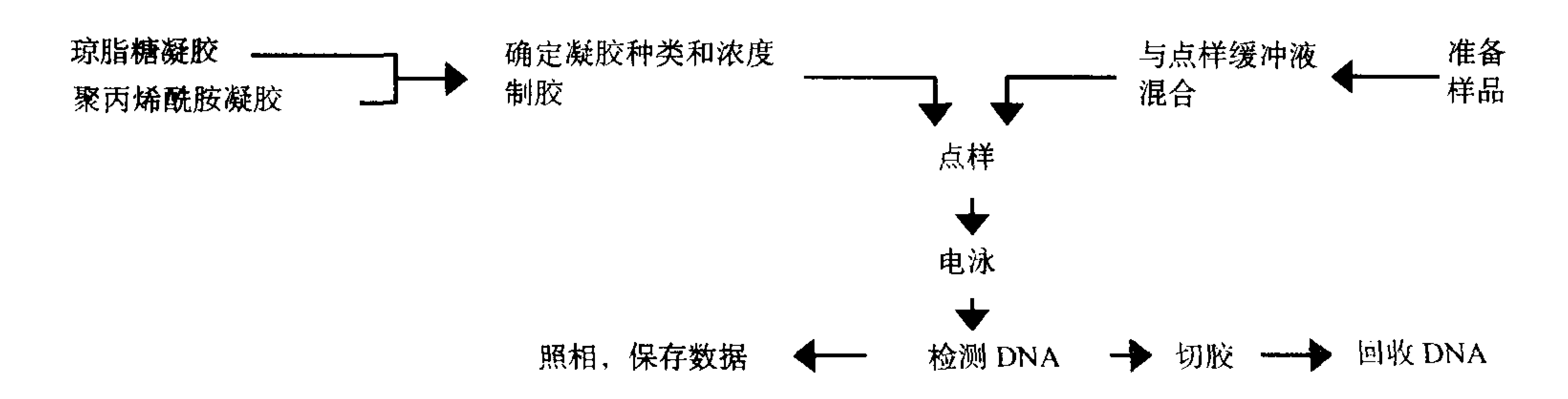
5. 大肠杆菌噬菌体 T4 多核苷酸激酶

大肠杆菌噬菌体 T4 多核苷酸激酶(bacteriophage T4 polynucleotide kinase, T4 PNK)将 ATP 或 DNA 5′ 端的磷酸基团转移到脱磷酸 DNA 的 5′ 端或 ADP 上。在 DNA 重组中，主要用于末端标记。常规方法合成的寡聚核苷酸的 5′ 端一般没有进行过磷酸化处理，因此，若利用它作接头时，需添加磷酸基团，此时常用 T4 PNK。

…Questions………………

1. 重组实验中常用的酶有哪几类？分别起什么作用？使用时应注意什么？
2. 利用限制性内切核酸酶消化 DNA 时应注意哪些问题？为什么酶的使用量一般不能超过反应体系总体积的 10%？如果酶加得过多会造成什么后果？
3. DNA 酶切反应不彻底的电泳图谱是怎么样的？DNA 若发生降解，酶切图谱又如何？实验中如何设计多个酶的切割反应？
4. 什么是 DNA 作图？其原理是什么？在基因操作中有何应用价值？
5. 为什么基因操作实验的成功与否与 DNA 的连接效率密切相关？如何提高 DNA 连接效率？连接反应的温度一般是 4~15℃，而不是连接酶的最适温度 37℃，为什么？
6. 如何防止线性载体的自连？哪些线性载体不需进行脱磷酸化处理就可直接用于重组实验？

第五章　电 泳 技 术



第一节　基 本 原 理

电泳是带电物质在电场中的趋向运动，是基因操作中常用的技术之一，是以分离或纯化 DNA(或 RNA)为目的。常用的电泳介质有琼脂糖和聚丙烯酰胺两种。

琼脂糖是一种线性多糖聚合物，是从红色海藻产物琼脂中提炼而来的。当琼脂糖加热到沸点后再冷却凝固就形成良好的电泳介质，其孔径决定于其浓度。聚丙烯酰胺是在催化剂 *N, N, N′, N′*-四甲基乙二胺(TEMED)和过硫酸铵(APS)作用下，丙烯酰胺(Acr)单体通过聚合反应形成长链，加入交联剂 *N, N′*-亚甲基双丙烯酰胺(Bis)，聚丙烯酰胺链交叉连接成网状结构，其网孔大小取决于聚合链长度和交联程度。电泳介质中的孔径对电泳迁移中的带电分子产生一种阻力，阻力的大小取决于带电分子的大小及其物理形状。

核苷酸的磷酸基团和碱基是带电分子。在双链 DNA 中，碱基处于配对状态，其电荷被中和掉，但磷酸基团的电荷仍被保留下来，因此在生理条件下，核苷酸的磷酸基团是带负电荷的，所以 DNA 分子是多聚阴离子，在电场中向正极迁移。由于磷酸基团在 DNA 上具有重复的特性，其数目取决于核苷酸的数目，即 DNA 大小，因此 DNA 分子带电量与其大小成正比。在一定电场强度下，若无任何介质阻碍迁移，则大 DNA 分子比小 DNA 分子跑得快。但在实际电泳中，由于使用了琼脂糖或聚丙烯酰胺等分子筛介质，对大分子 DNA 产生了较强的阻力，因此大分子 DNA 尽管有较高的带电量，但仍难以快速前进；小分子 DNA 由于能够穿越介质网孔，其带电量尽管相对较小，但仍能快速迁移到正极。因此，不同的 DNA 分子在琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶中产生了不同的迁移距离，这种迁移距离的差异使得不同大小 DNA 得以分离。这就是 DNA 电泳的基本原理。

对于单链 RNA 或单链 DNA 而言，由于碱基没有形成配对，因此其碱基所带电荷也被保留下来；又由于单链核酸分子在分子内有可能形成局部配对，因而中和了部分的碱基电荷。不同的单链核酸分子在不同的溶液中，其分子内的配对关系不一样，导致实际电泳中的单链核酸分子的带电关系和分子形状变得较双链 DNA 更为复杂，不能简单地依据其迁移情况来分离不同大小的单链核酸分子。但是，若在缓冲液和凝胶中加入尿素

或甲醛等核酸变性剂，使其分子内的配对结构充分打开，保证其完整的单链状态，使其带电量和分子形状无关，仅与分子大小有关，也能利用电泳来达到分离不同大小核酸的目的(图 5-1)。

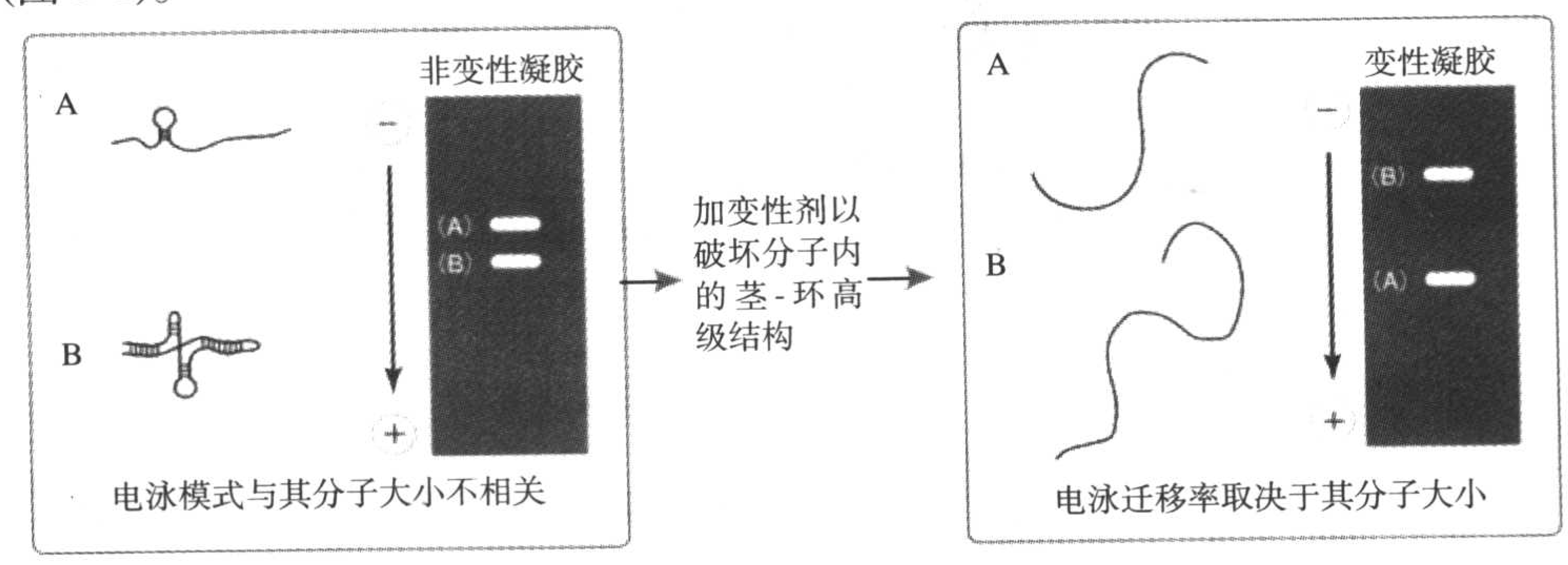


图 5-1　单链核苷酸的高级结构与电泳的关系

DNA 分子的高级结构也影响电泳迁移率。碱法提取的质粒 DNA 中包含有构象不同的多种 DNA——开环、闭环和线性等，它们混杂在一起。对于分子质量相同、构象不同的 DNA，表现出不同的物理直径，因而电泳阻力不一样，进而在电泳中表现出多个条带(图 5-2)。若用限制性内切核酸酶消化所有构型的 DNA，则都表现出一致的线性分子，电泳中表现出唯一的条带(图 5-2)。

通常浓度下的琼脂糖凝胶所能分辨的 DNA 大小在几十 kb 以下。若持续地改变电泳方向(脉冲式)，DNA 分子则呈蛇形爬行。由于高分子 DNA 难以转换迁移方向，因而表现出较小的迁移距离，分子质量越大，转换方向越慢。因此，脉冲式电泳能将不同大小的高分子质量 DNA 分离开来(图 5-3)。

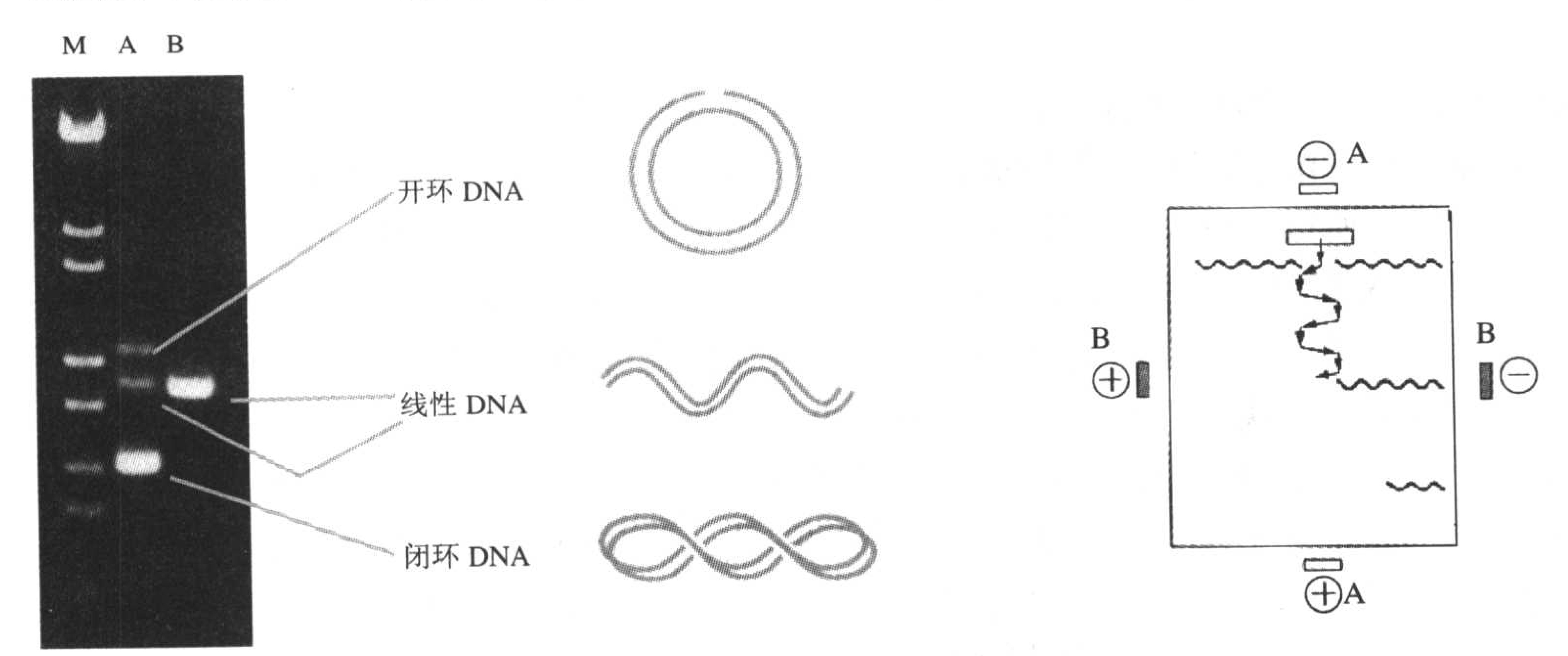


图 5-2　DNA 高级结构对电泳迁移的影响

M. 相对分子质量标准物；A. 纯化的质粒；

B. 酶切片段(仅一个切点)

图 5-3　脉冲式电泳与高分子 DNA 的迁移

A 和 B 为不同的脉冲电泳方向，DNA 沿箭头方向迁移

与蛋白质结合的 DNA 复合体，其迁移率较游离 DNA 慢。因此，利用电泳方法也能鉴定 DNA 上是否有蛋白质附着，这种方法叫凝胶电泳阻滞分析(electro-mobility shift assay，EMSA)(图 5-4)。

分析单链 DNA 中的高级结构，可采用单链构象多态性分析方法(single strand conformation polymorphism，SSCP)。变性后的单链 DNA 复性时，有可能形成各种茎-环构象。不同构象 DNA 在非变性聚丙烯酰胺凝胶中表现出不同的迁移率，根据突变前后的电泳迁移变化可确定突变位点对 DNA 构象的影响(图 5-5)。

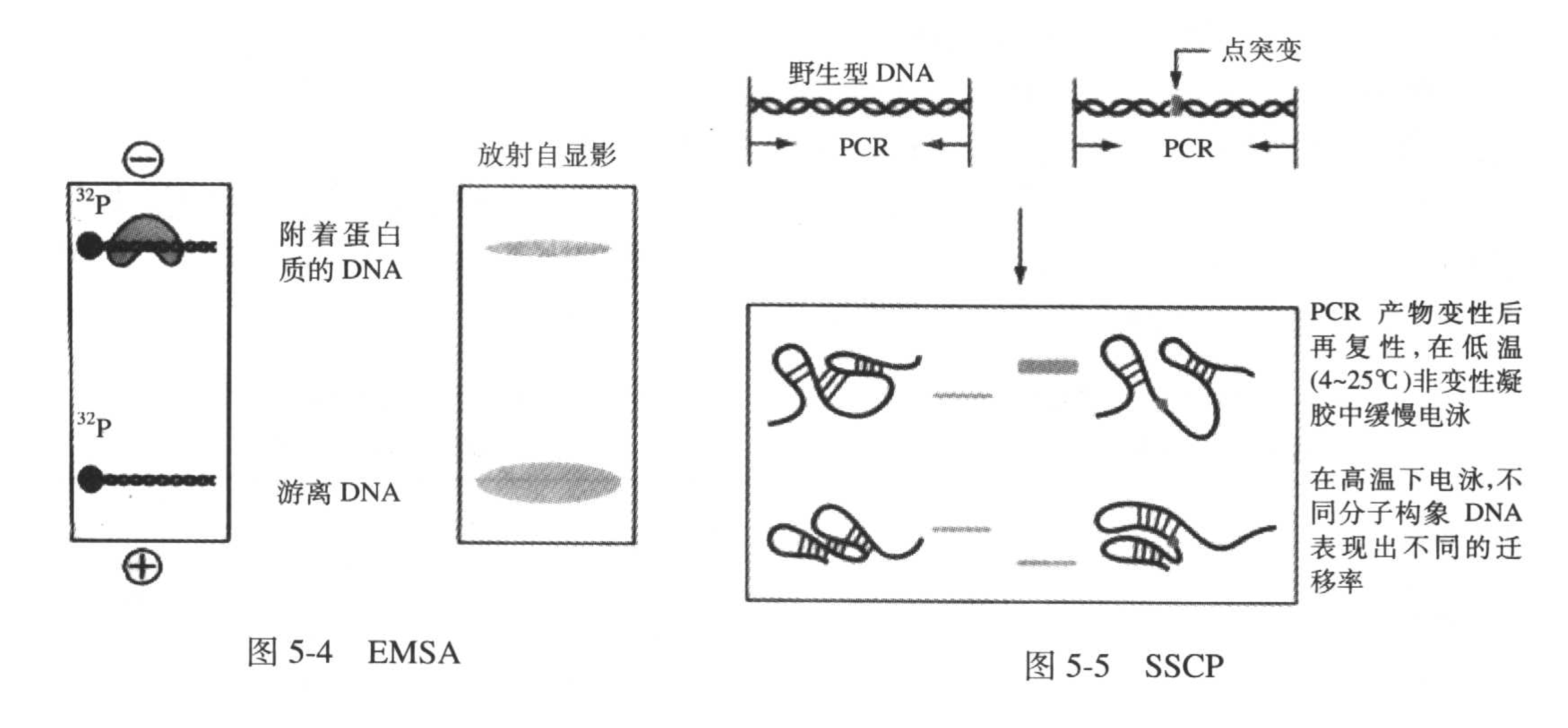


图 5-4　EMSA

图 5-5　SSCP

第二节　琼脂糖凝胶电泳

琼脂糖凝胶的分离效果好，操作简单，是分离 DNA 最常用的介质，分离 DNA 的有效范围为 0.5~20 kb，若要分离更小的 DNA 则用聚丙烯酰胺凝胶进行电泳(表 5-1)。

表 5-1　利用电泳技术分离核酸

项目	依据分子大小					依据分子构象		
	双链 DNA			单链 DNA	RNA	单链 DNA[b]	双链 DNA	DNA 与蛋白质复合物[c]
	10~2000 bp	0.1~数十 kb	数 Mb(基因组等)					
介质种类	聚丙烯酰胺	琼脂糖	琼脂糖	聚丙烯酰胺或琼脂糖	琼脂糖	聚丙烯酰胺	琼脂糖	聚丙烯酰胺
是否添加变性剂	否	否	否	是	是	否	否	否
电泳方向	常规	常规	不规则[a]	常规	常规	常规	常规	常规

注：a. 脉冲电泳法；b. SSCP 法；c. EMSA 法。

1. 选择琼脂糖

各商家出售的琼脂糖纯度、强度、固化温度相差很大，应根据实验目的选择合适的琼脂糖。常规电泳中使用普通的琼脂糖，其浓度与分离范围的关系见表 5-2。如需通过胶熔化方法回收 DNA，则应采用低熔点琼脂糖。分离 200 bp 以下的短 DNA 片段，应采用 NuSive GTG 琼脂糖(FMC 公司)。如凝胶回收的 DNA 需要纯化，宜使用昂贵的高纯度 Seakem GTG 琼脂糖(FMC 公司)。

2. 试剂配制

电泳缓冲液有 TAE、TBE 或 TPE 等。琼脂糖凝胶电泳一般使用 TAE，但长时间电泳，TAE 容易失去缓冲能力，此时可选用缓冲能力强的 TBE。TBE 对切胶回收的 DNA 产生影响，因此切胶回收 DNA 的电泳不能使用 TBE。

配制电泳缓冲液时，一般先配制高浓度储液，用时稀释，稀释液可反复使用多次，用时用 pH 试纸检查 TAE 的 pH 决定是否可以继续使用。

电泳时，DNA 样品中应添加点样缓冲液，然后一起载入胶孔中。点样缓冲液中含有甘油或蔗糖以帮助 DNA 沉入胶孔底部。为了使样品着上颜色以指示其迁移情况，在点样缓冲液中还需添加溴酚蓝或二甲苯青等指示剂(表 5-3)。

表 5-2 琼脂糖浓度与 DNA 有效分离范围的关系

琼脂糖浓度/(%, *m*/*V*)	分离范围/kb	琼脂糖量/(g/500 mL TAE)
0.3	5~60	1.5
0.6	1~20	3.0
0.7	0.8~10	3.5
0.9	0.5~7	4.5
1.2	0.4~6	6.0
1.5	0.2~3	7.5
2.0	0.1~2	10.0

表 5-3 与指示剂迁移相当 DNA 大小与凝胶浓度的关系

介质	二甲苯青/bp	溴酚蓝/bp
1.0% 琼脂糖凝胶	2000	
1.4% 琼脂糖凝胶	1600	200
5% 聚丙烯酰胺凝胶	280	65
8% 聚丙烯酰胺凝胶	105	25
10% 聚丙烯酰胺凝胶	95	25~30
7 mol/L 尿素+6% 聚丙烯酰胺凝胶	110	30
7 mol/L 尿素+8% 聚丙烯酰胺凝胶	70	18
7 mol/L 尿素+10% 聚丙烯酰胺凝胶	60	15
7 mol/L 尿素+15% 聚丙烯酰胺凝胶	46	12
7 mol/L 尿素+20% 聚丙烯酰胺凝胶	29	9

3. 相对分子质量标准物

为了用电泳方法推测样品 DNA 的相对分子质量，需要同时对相对分子质量已知的标准物进行电泳。相对分子质量标准物可从商家购买，也可在实验室内自制。下面介绍几种自制相对分子质量标准物的方法。

Protocols Time：操作 30 min~3 h

(1) λ/*Eco*T14 I 标准物

ⓐ

λ DNA	*x* μL(约 40 μg)
10×H 添加缓冲液	40 μL
*Eco*T14 I(72 U)	6 μL

用双蒸水定容至 400 μL

↓

ⓑ 37℃条件下保温 4~5 h 或过夜。

↓ O/N

ⓒ 酚抽提[a]，乙醇沉淀[a]，干燥后溶于 350 μL TE 中[a]，再添加 50 μL 10×点样缓冲液，4℃保存，每次取 3 μL (约 300 ng)直接电泳。

a. 本步骤可省略。

(2) pBR322/*Hae* III 标准物

ⓐ

pBR322	*x* μL(约 30 μg)
10×M 添加缓冲液	8 μL
Hae III(80 U)	5 μL

用双蒸水定容至 300 μL



ⓑ 37℃条件下保温 4~5 h 或过夜，酶切 DNA。

↓ O/N

ⓒ 添加 40 μL 10×点样缓冲液，4℃保存，每次取 2 μL 直接电泳。

4. 琼脂糖凝胶电泳

Materials

(1) 电泳槽[a]

(2) 梳子[b]

(3) 胶布[c]

(4) 电泳仪

(5) 琼脂糖溶于 TAE 或 TBE[d](附录一)

(6) 电泳缓冲液(与熔胶缓冲液一致)

(7) 点样缓冲液

a. 6 cm×9 cm 凝胶用量为 5~10 mL。

b. 配套的 6 cm×9 cm 凝胶梳子孔数为 12，也可用 1 孔、4 孔或 3 孔的梳子。

c. 医用胶布、高温高压灭菌指示带、透明胶带、纸胶带等均可。宽度以 2 cm 为宜。

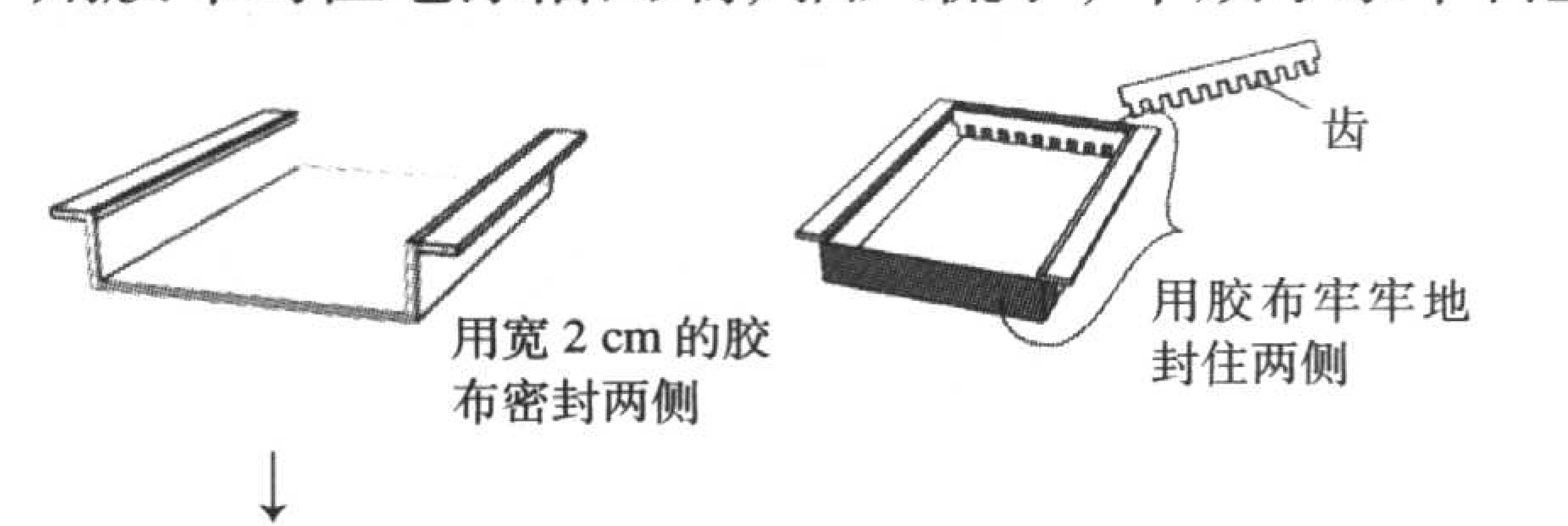
d. 对于数 kb 长 DNA 片段的分离多用 TAE，对于 1 kb 以下短 DNA 片段的分离多用 TBE。

Protocols　　　　Time：90 min

ⓐ 称量琼脂糖，转入耐热广口瓶内。加 TAE(或 TBE)，用微波炉熔化[e]。

↓

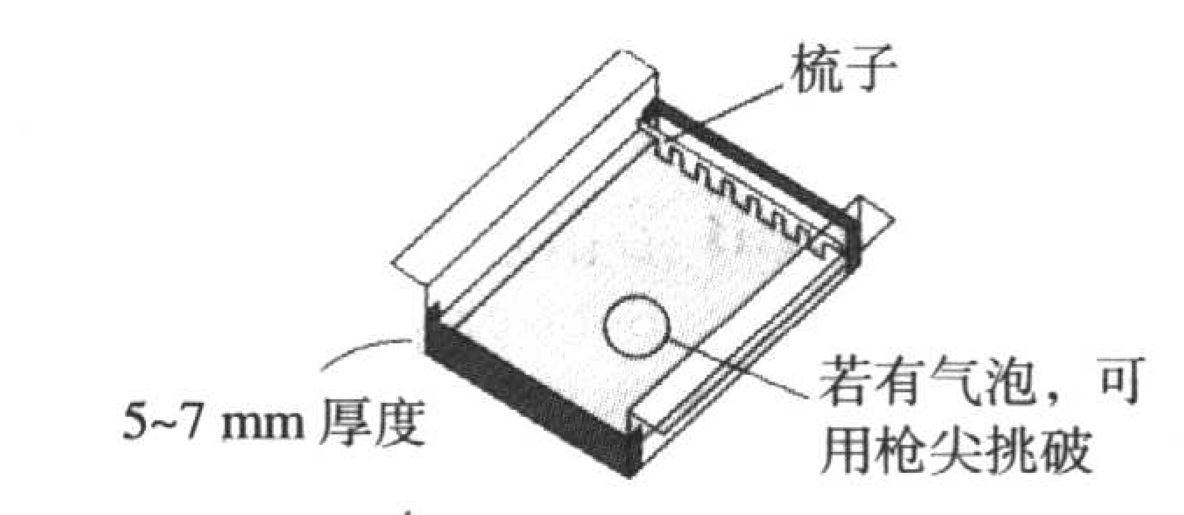
ⓑ 用胶布封住电泳槽两端，插入梳子，平放于水平台上。



e. 熔化的琼脂糖可再次加热熔解，重新制作凝胶。熔解凝胶或打开沸腾盖子，易挥发掉水蒸气，从而改变琼脂糖浓度。因此，沸腾后的凝胶不宜马上开盖，而应等温度下降到手可接触的温度时才开盖。

↓

ⓒ 凝胶冷却到 50~60℃(手能触摸的温度)后倒入电泳槽[f]。



↓

f. 待凝胶完全凝固后转至电泳槽内的缓冲液中，然后再拔出梳子。凝胶充分凝固前拔梳子可能导致穿孔。在保湿状态下，4℃下可存放凝胶 1~2 星期，常温下可存放数日。

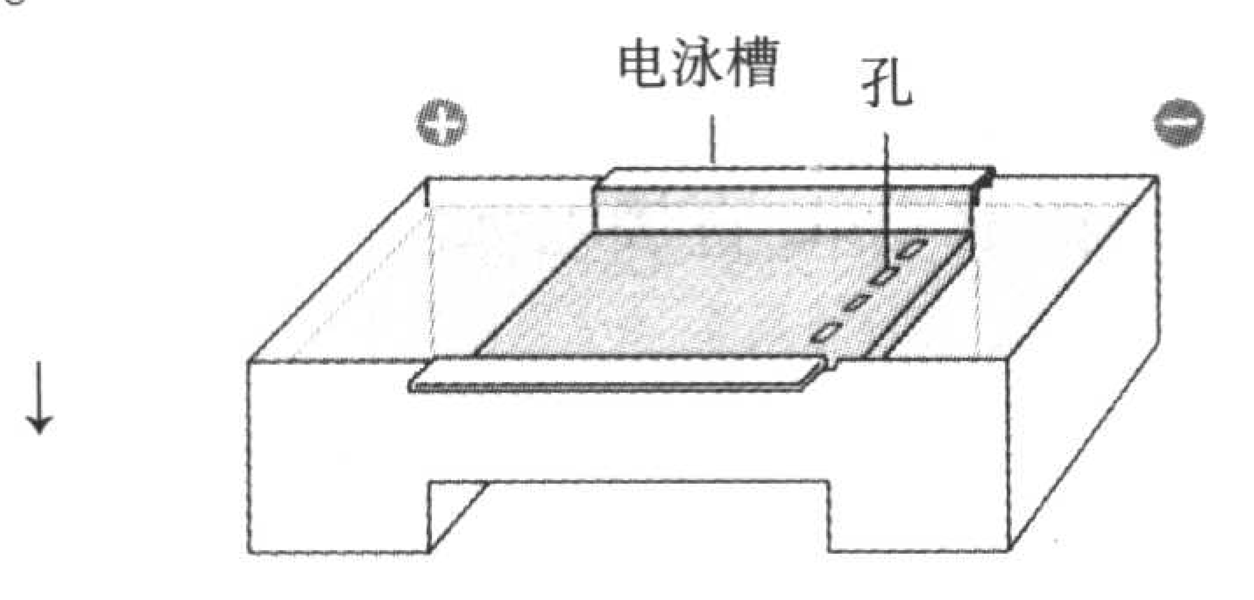
ⓓ 凝胶凝固后撕下胶布，直接(带上梳子)转移到电泳槽中[g, h]。

↓

ⓔ 加电泳缓冲液至充分没过凝胶。拔梳子时应谨慎。

↓

ⓕ 阴极(–)(黑色)一般位于右侧，阳极(+)(红色)一般位于左侧。



↓

g. 低熔点琼脂糖的固化比普通琼脂糖多需要3~10倍时间。

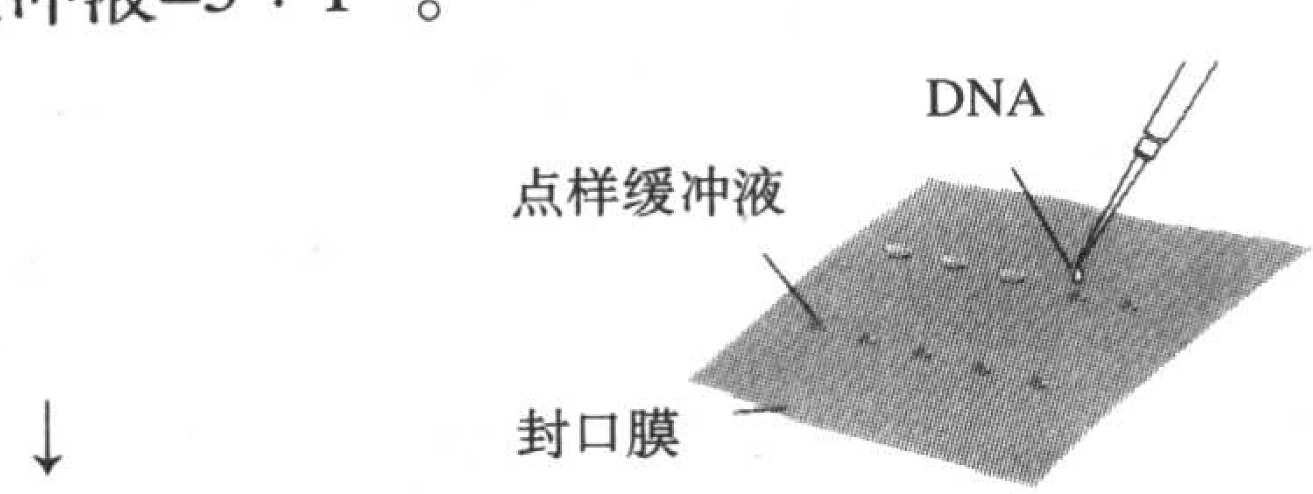
h. 电泳方向是阴极(黑色)朝向阳极(红色)！绝不能弄错。

i. 乙醇沉淀DNA的操作中，应待乙醇完全挥发后才能用水或TE溶解沉淀，否则残留的乙醇会使DNA样品在缓冲液中迅速扩散。沉淀中残留过多的盐分改变DNA样品的盐浓度，可能导致错误的电泳图谱。

j. 样品溶液的盐浓度必须低于缓冲液的盐浓度，应在100 mmol/L以下。

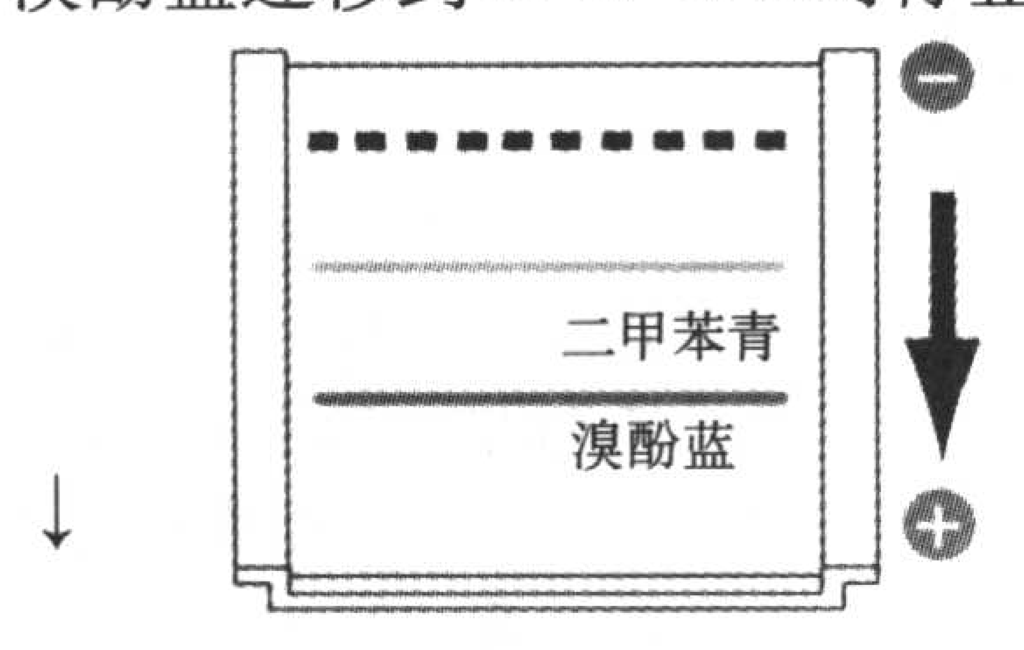
k. DNA样品与点样缓冲液混合时，可在Eppendorf管中进行，也可在封口膜上操作(左图)。

ⓖ DNA样品中[i]加入点样缓冲液，混合均匀。然后小心地加入凝胶孔中。DNA样品：6×点样缓冲液=5：1[j,k]。



↓

ⓗ 恒压电泳，6 cm×9 cm、0.7%凝胶用80~100 V电泳1 h[l]。溴酚蓝迁移到33%~66%时停止电泳[m]。



↓

l. 电泳的电压、时间因胶的浓度及分离DNA片段的大小而异。高压电泳，分离不明显；低压电泳，DNA易扩散。分离差异小的DNA片段或回收DNA时，应采用50 V电泳。电泳时应盖上盖子，以防漏电。

m. 琼脂糖浓度为0.7%的凝胶，二甲苯青在7 kb附近，溴酚蓝在1 kb附近。

ⓘ 浸泡于溴化乙锭溶液中[n]。

n. 电泳完毕后，凝胶易从槽中滑落，应特别小心。

5. DNA染色

Materials

(1) 暗室
(2) 紫外发光仪[a]
(3) 瓷盘(事先加入溴化乙锭)
(4) 保鲜膜
(5) 照相设备
(6) EB溶液(附录一)

a. 发射302 nm或312 nm紫外线。

Protocols　　Time：30 min

ⓐ 电泳完毕后，将胶浸入到 EB 溶液中 10~30 min。

↓

ⓑ 在紫外发光仪上铺上保鲜膜，放入凝胶，打开紫外灯开关，观察。

↓

ⓒ 照相[b]。

b. 当 EB 将整个凝胶染成橙色时，难以观察条带。此时，可用水振荡凝胶 10~30 min 以消除背景。使用完毕的 EB 可加次氯酸钠消除毒性。

…Tips……………

Clifford 等人在 1977 年，比较鉴定了三种不同紫外线光源激发 EB 产生荧光的灵敏度、褪色效应和对 DNA 的损伤作用。短波 254 nm 紫外线由核酸吸收后传递给 EB，灵敏度较高，对核酸的损伤作用最大，会造成核酸链断裂或形成嘧啶二聚体，照射时间过长还会引起褪色效应；320 nm 或 360 nm 紫外线主要由 EB 分子直接吸收，对核酸的断链和嘧啶二聚体形成等效应小，褪色反应轻微，灵敏度为 320 nm>254 nm>360 nm。故一般电泳后需回收的 DNA 样品，应在 360 nm 波长紫外线灯下操作，以减少对 DNA 的损伤。320 nm 波长紫外线对于观察样品(灵敏度最好)和长时间紫外线下操作(如切割含所需 DNA 片段凝胶的回收)均为最佳的选择。

第三节　从琼脂糖凝胶中回收 DNA

从电泳凝胶中回收 DNA 片段是基因重组实验中经常遇到的操作，包括从凝胶中回收 DNA 及回收 DNA 的纯化两个部分。回收 DNA 的方法主要有：使用低熔点琼脂糖、凝胶熔化、DEAE 滤纸及试剂盒等。回收率一般在 30%~70%，回收的 DNA 样品可能混杂有影响酶促反应的抑制剂。

1. 使用 GENECLEAN

其原理是：先用碘化钠熔化琼脂糖，将 DNA 吸附在玻璃珠上，再回收 DNA。

Materials

(1) 恒温水浴锅

(2) 小型离心机

(3) GENECLEAN II 试剂盒(Bio101 公司)(包括 NaI、玻璃奶及 NEW WASH CONCENTRATE 1)[a]

NEW WASH 溶液配制：

NEW WASH CONCENTRATE 1	14 mL
双蒸水	280 mL
乙醇	310 mL

充分混匀，−20℃保存备用

a. 本试剂盒能回收 DNA 片段的大小为 0.2~20 kb，回收率为 30%~70%。高分子质量 DNA 的回收率较低。

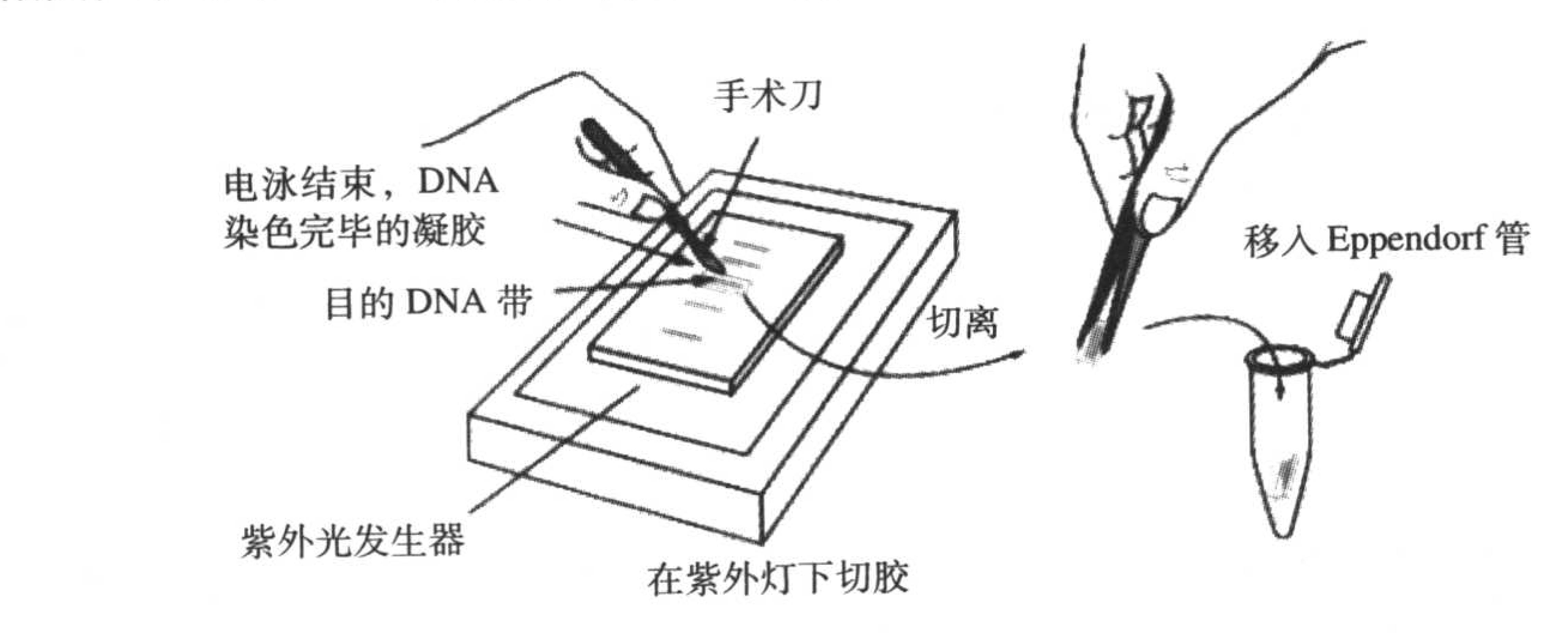
Protocols　　Time：45 min

ⓐ 实验前，预备 55℃水浴，充分混匀玻璃奶。

↓

b. 切离凝胶时，尽可能将多余的凝胶去除干净。
c. 也可长时间保存于−20℃。

ⓑ 从琼脂糖凝胶中切下 DNA 片段，转移入 Eppendorf 管[b]，−70℃冻 10~20 min[c]。



↓

ⓒ 将冰冻凝胶放置于室温下，待温度升至室温后用枪尖捣碎凝胶。加 2~3 倍体积 NaI，在旋涡混合器帮助下溶解凝胶。

↓

ⓓ 55℃下保温 3 min[d]。

↓

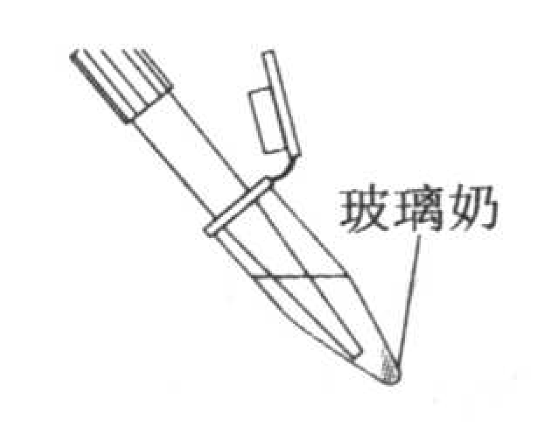
ⓔ 加玻璃奶混合均匀[e]。

↓

ⓕ 冰上放置 5 min，12 000 r/min 离心 5 s。

↓

ⓖ 弃上清(右图)。注意不要吸走玻璃奶。



↓



ⓗ 按玻璃奶量的 100~200 倍(通常为 500 μL)添加 NEW WASH 溶液。

↓

ⓘ 12 000 r/min 离心 5 s，弃上清。

↓

ⓙ 重复ⓗ~ⓘ步骤 3 次。

↓

ⓚ 充分弃去上清，包括管壁上的溶液。

↓

ⓛ 加 8 μL TE 悬浮玻璃奶，注意混匀。

↓

ⓜ 55℃保温 3 min，12 000 r/min 离心 30 s。

↓

ⓝ 将上清转移到新管，注意不要吸出玻璃奶。

↓

ⓞ 重复ⓛ~ⓝ步骤。

↓

ⓟ 对回收的 Eppendorf 管离心(12 000 r/min、30 s)，上清转入新管[f]。

↓

d. 尚有不溶物时，可延长温浴时间，但不能超过 15 min。

e. 5 μg DNA 添加 5 μL 玻璃奶。当 DNA 量超过 5 μg 时，每增加 0.5 μg DNA 则增加 1 μL 玻璃奶。

f. 为去除吸入的少量玻璃奶。

ⓠ 离心干燥(10 min)，弃去乙醇[g]。

g. 取少量电泳，确定回收量及纯度。收集的 DNA 可直接用于连接反应等操作。

2. 使用 Qiagen 公司的旋转柱

Qiagen 公司的提取试剂盒中不含 NaI，但可能会含有类似的盐类，在此高盐作用下溶解琼脂糖，然后在酸性条件下将 DNA 吸附在玻璃珠上。旋转柱(Spin Column)使用二氧化硅膜吸附 DNA。因此，仅进行简单的离心操作就能纯化 DNA。

Materials

(1) 小型离心机(本操作流程中转速均为 12 000 r/min)
(2) 恒温水浴槽(预热到 50℃)
(3) 1.5 mL Eppendorf 管
(4) QIA 快速凝胶抽提试剂盒(QIAGEN 公司)
包括旋转柱、QG 缓冲液、浓缩的 PE 缓冲液、EB 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl，pH8.5)及 2 mL 样品回收管
(5) 异丙醇
(6) 3 mol/L NaAc(pH5.0)[a](附录一)
(7) PE 缓冲液中添适量的 100%乙醇

a. QG 缓冲液中含有 pH 指示剂，凝胶溶解时若呈酸性，则呈黄色，可以继续下一步实验；若呈紫色(微碱性，pH7.5 以上)，则用 NaAc 调 pH 至酸性状态。

Protocols　　　　Time：2 h

ⓐ 用手术刀切下含 DNA 的凝胶，转入 Eppendorf 管中，称重。通常为 0.1 g 左右。

↓

ⓑ 按 3 倍凝胶量添加 QG 缓冲液。考虑到柱的最大体积，凝胶应控制在 0.4 g 以下。

b. 为加速凝胶的溶解，可使用旋涡混合器。2%以上凝胶可能需要较长时间。

↓

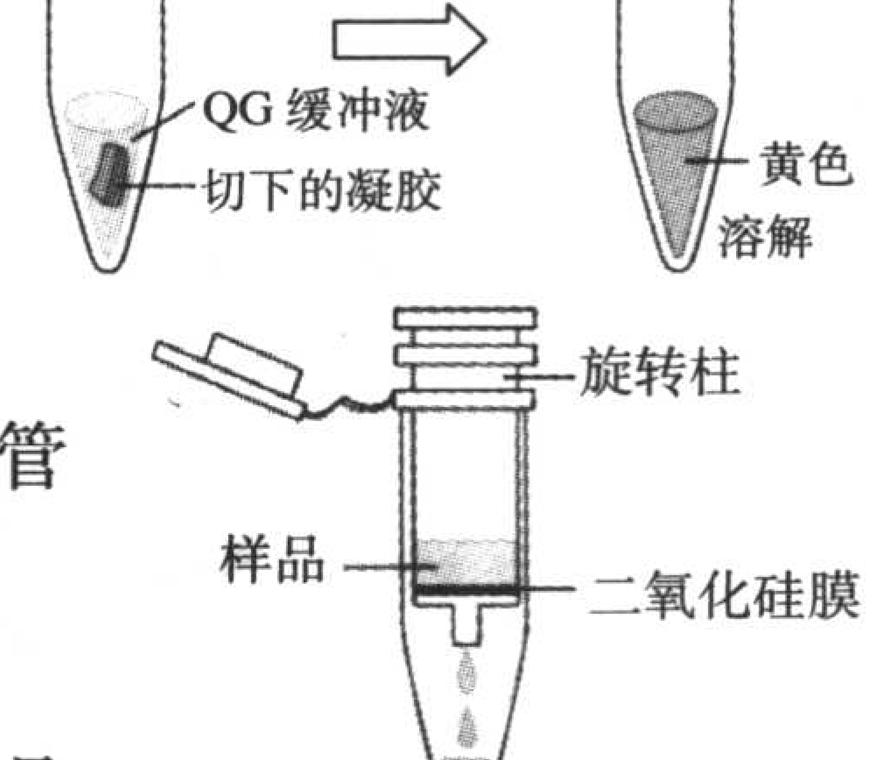
ⓒ 50℃保温 10 min，充分溶解凝胶[b]。

↓

ⓓ 确定指示剂颜色为黄色，若为橙色至紫色，加 10 μL NaAc，颜色可变黄(右图)。

↓

ⓔ 加与凝胶等量的异丙醇，混匀，转入插有 2 mL 样品收集管中的柱里(右图)。



↓

ⓕ 离心 1 min 后，弃去收集管中的滤液，再将柱置于同一样品回收管中。

↓

ⓖ 加 0.5 mL QG 缓冲液，离心。再加 0.75 mL PE 缓冲液，离心。

↓

ⓗ 弃去滤液，再离心一次。

↓

ⓘ 将柱置于另一 1.5 mL Eppendorf 离心管中，加 50 μL EB 缓冲液或无菌水，离心 1 min。回收的 DNA 即在溶液中[c]。

c. 为了得到较高浓度的 DNA 溶液，加 30 μL EB 缓冲液于柱中央，离心 1 min。

EB 缓冲液

纯化 DNA

↓

ⓙ 得到约 50 μL 纯化的 DNA 溶液[d]。

d. 能回收的 DNA 大小在 70 bp~ 10 kb 范围，柱吸附 DNA 的最大量为 10 μg，回收率为 70%。超过 4 kb DNA 回收率较低。

3. DNA 回收的其他方法[a]

a. 回收的 DNA 进行酚抽提、乙醇沉淀后，溶于 TE 中，回收率为 30%~70%。

1) DEAE/纤维素滤膜电泳

制备琼脂糖凝胶时，在凝胶中加入 EB 染色液，点样后电泳至 DNA 样品被分离清晰，暂停电泳，将 DEAE/纤维素滤膜(Whatman 公司)插于紧贴目的带下游位置，再继续电泳，使目的 DNA 迁移到滤膜上。由于滤膜具有吸附 DNA 的特性，因此目的 DNA 被吸附在滤膜上(图 5-6)。取出滤膜漂洗干净，再用 1.0 mol/L NaCl 溶液溶解 DNA。

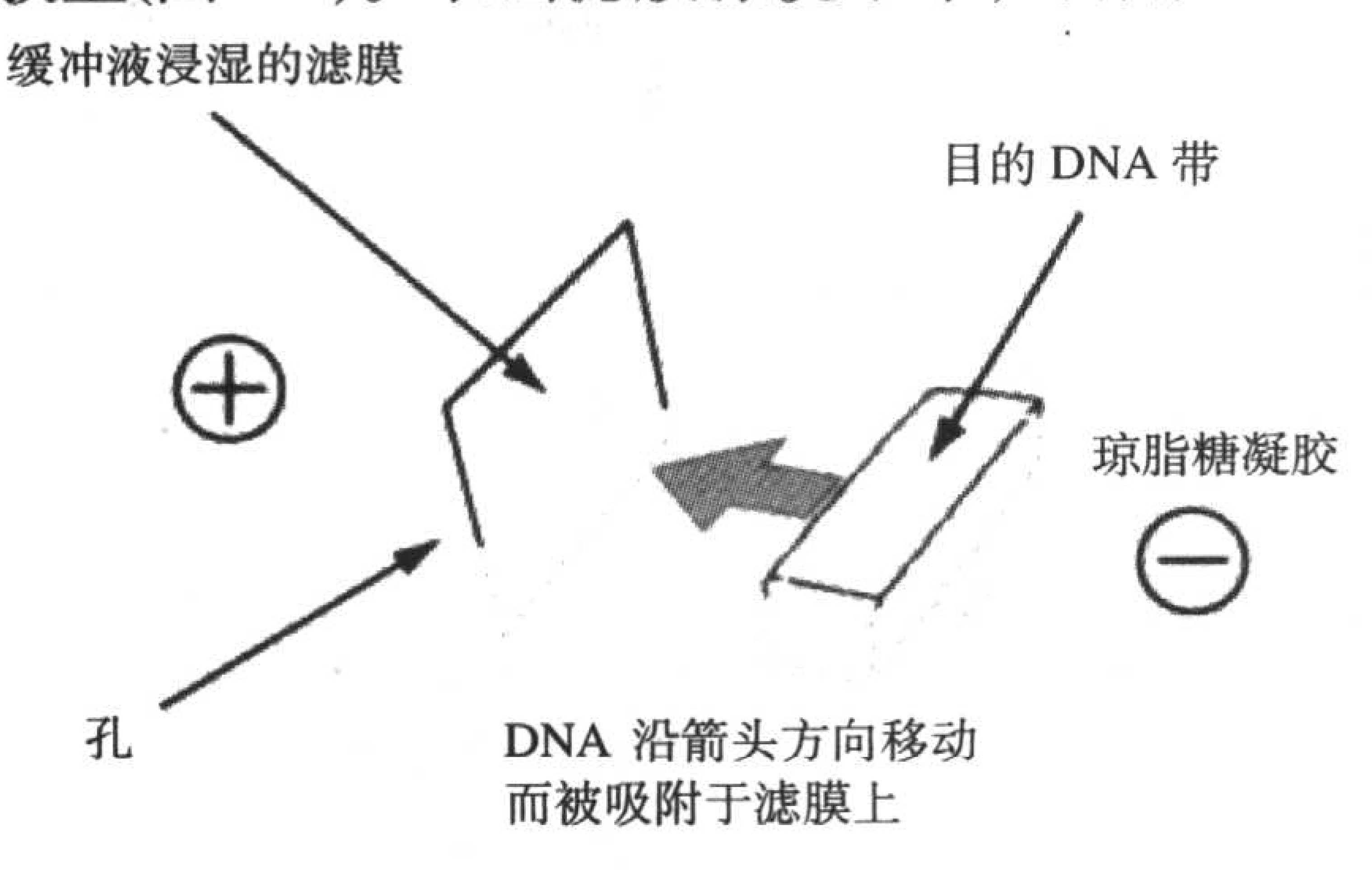


图 5-6　用 DEAE/纤维素滤膜回收 DNA

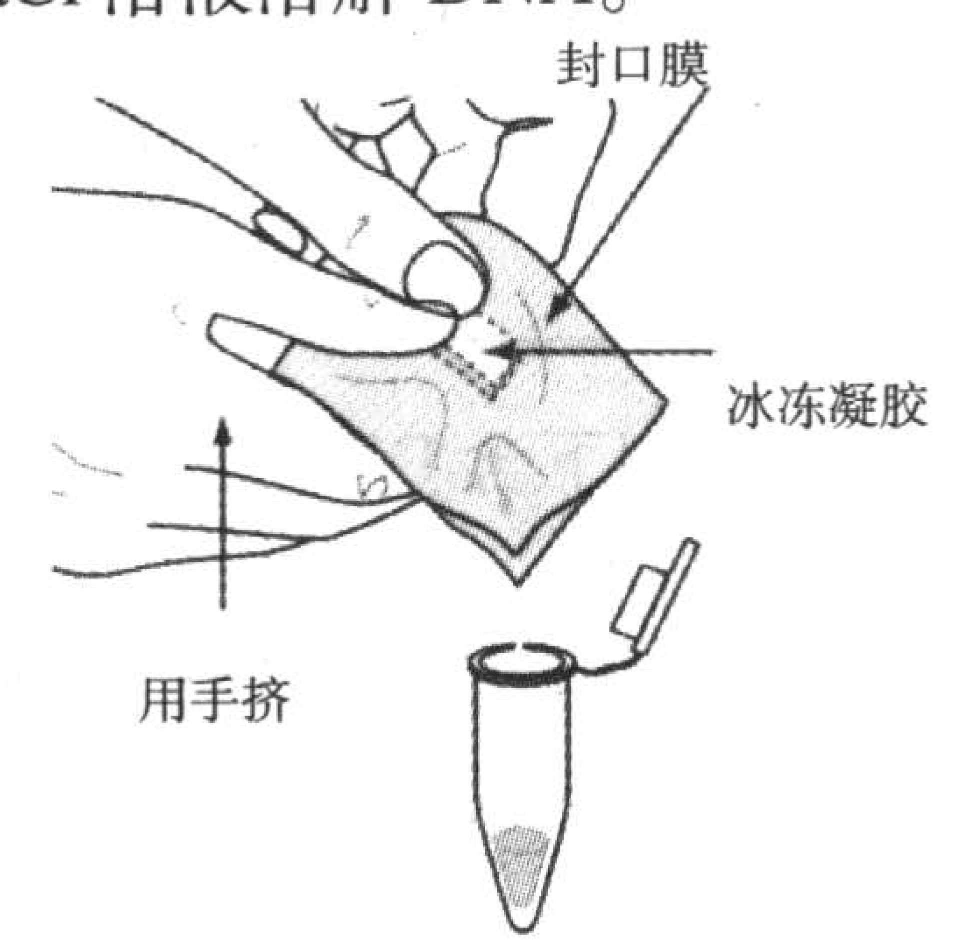


图 5-7　挤压回收 DNA

2) 挤压回收

用低熔点琼脂糖电泳，加热熔解切下的目的 DNA 凝胶带(有时需补充适量缓冲液以扩大体积)，然后进行酚抽提、乙醇沉淀等操作。对于普通的琼脂糖凝胶，也可置于冰箱中使之结冰以冻裂琼脂糖凝胶网状结构，然后挤压，回收 DNA(图 5-7)。

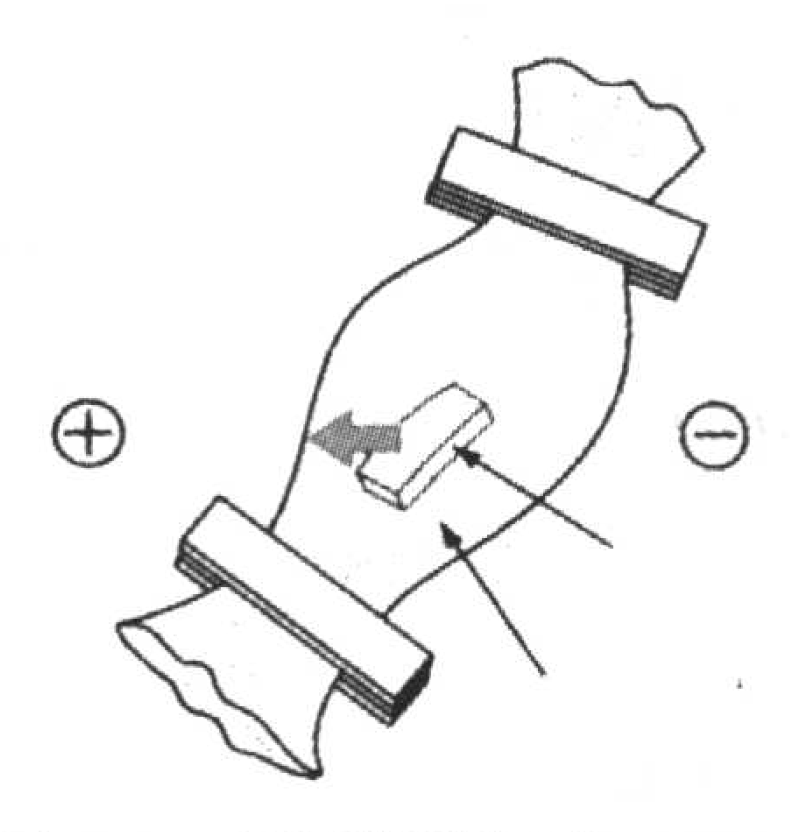


图 5-8　用透析袋回收 DNA

装于透析袋中心的凝胶 DNA 在电场作用下按箭头方向流出，储存于透析袋内

3) 透析袋回收

将凝胶置于透析袋中，电泳析出 DNA(图 5-8)。电泳析出时使用低浓度缓冲液，凝胶置于阴极侧，DNA 随电泳进入阳极侧。吸取阳极侧缓冲液，然后对回收的电极缓冲液进行浓缩。



琼脂糖凝胶电泳常见问题及解决途径：

问题	原因	解决途径
带型重影	梳子斜放	梳子垂直放置
	缓冲液量过多，表面与底部存在温差	缓冲液面以高出胶面 2 mm 以内为宜
带型零乱	电压过大	根据电泳槽设置合适的电压
	上样量过多	稀释 DNA 样品浓度或减少上样量
	点样孔损坏	重新制胶
	与点样缓冲液混合不均匀	用微量移液器吸打混匀。若仍未解决，考虑重新纯化 DNA 样品
斜着泳动	梳子歪放	重新摆放梳子
	制胶板呈歪的状态	矫正或更换制胶板
拖尾	电压过大	根据电泳槽设置合适的电压
	缓冲液离子浓度过高	调整盐浓度在 0.1 mol/L 以下
	琼脂糖电压通过力强	使用电压通过力低的琼脂糖
	梳子插得过深，样品从胶板下部泳动	梳子底部与胶槽应隔 1~2 mm
	上样量过多	稀释样品浓度或减少上样量
	酶切不完全	使用活性酶重切

第四节　聚丙烯酰胺凝胶电泳

1. 聚丙烯酰胺凝胶

聚丙烯酰胺凝胶孔径比琼脂糖凝胶小，因此能将小分子质量核酸，特别是 1 kb 以下的 DNA 清晰地分离开。常用于寡聚核苷酸或 100 bp 以下的小 PCR 产物的分离(表 5-4)。与琼脂糖凝胶电泳一样，分离的 DNA 片段也能回收。

表 5-4　有效分离的 DNA 大小与胶浓度的关系

聚丙烯酰胺浓度/%(*m*/*V*)	分离的 DNA 大小/bp
3.5	1000~2000
5.0	80~500
8.0	60~400
12.0	40~200
20.0	1~100

2. 试剂组成

常将丙烯酰胺配成 30%浓度的储液(附录一)，制胶时根据需要来配制适当的胶浓度(表 5-5)。

表 5-5　聚丙烯酰胺凝胶的配制

凝胶浓度	3.5%	5.0%	8.0%	12.0%	20.0%
30%丙烯酰胺储液/mL	1.16	1.66	2.66	4.00	6.66
10×TBE/mL	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
双蒸水	7.84	7.34	6.34	5.00	2.34

3. 制备聚丙烯酰胺凝胶

Materials

(1) 平面凝胶板(玻璃材料，106 mm × 10 mm，厚度为 1 mm)

(2) 平板电泳槽

(3) 梳子

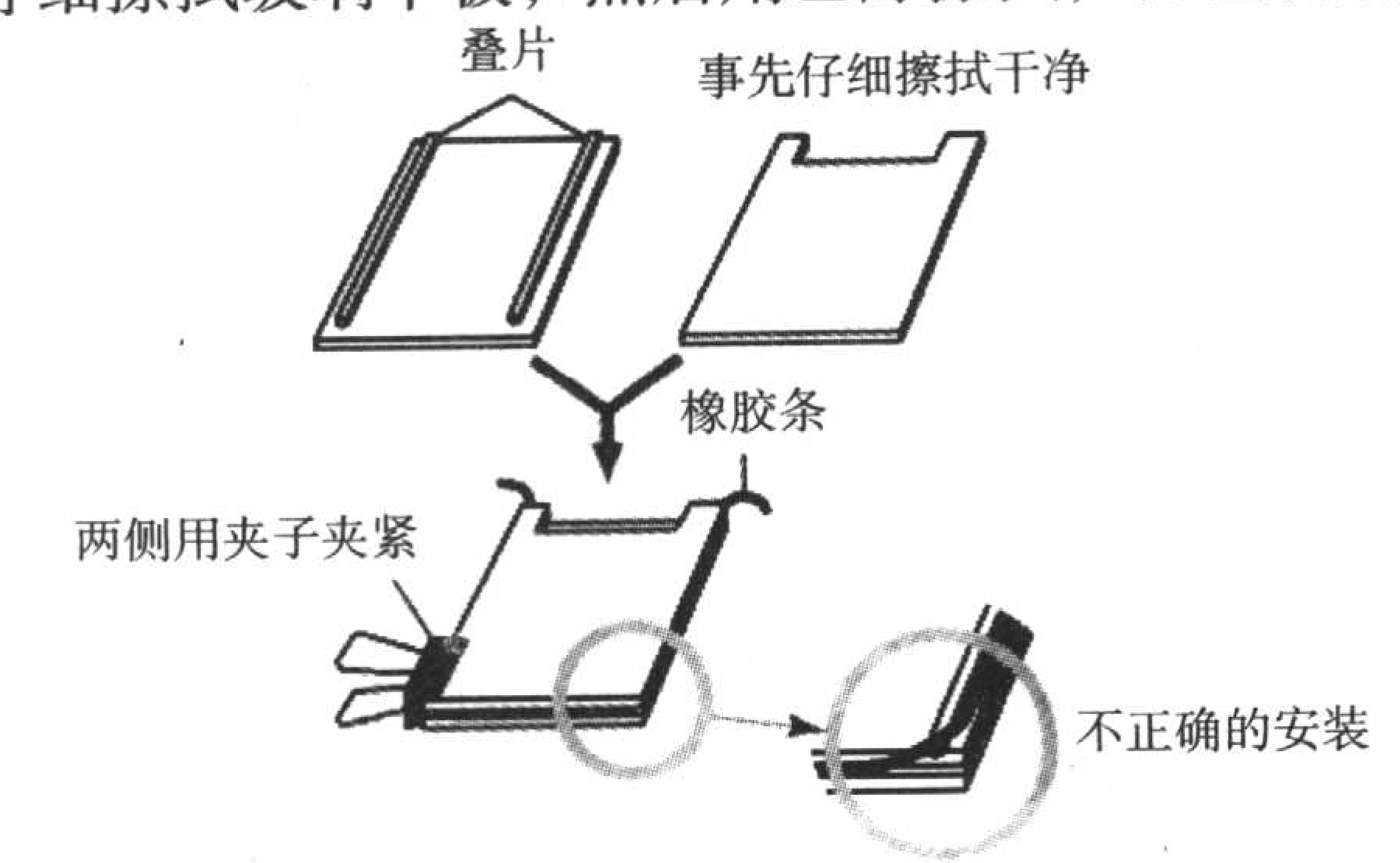
(4) 橡胶条
(5) 夹子
(6) 30%丙烯酰胺储液[a](附录一)
(7) 电泳缓冲液(TBE)[a](附录一)
(8) N, N, N′, N′-四甲基乙二胺(TEMED)[a]
(9) 10%过硫酸铵(APS)[a]

a. 保存于4℃。

Protocols　　Time：20 min

ⓐ 用双蒸水仔细擦拭玻璃平板，然后用乙醇擦拭，再组装成胶板[b]。

b. 将双蒸水喷在平板上，用纸巾擦拭。乙醇擦拭方法与此类似。



↓

ⓑ 配制一定浓度的丙烯酰胺混合液：

7%凝胶，依次添加下列试剂：

双蒸水	6.6 mL
10×TBE	1 mL[c]
30%丙烯酰胺溶液	2.3 mL
APS	少量[d]
TEMED	10 μL

↓

ⓒ 加完TEMED后，立即倒入玻璃板间隙内，然后插上梳子。注意不要产生气泡。

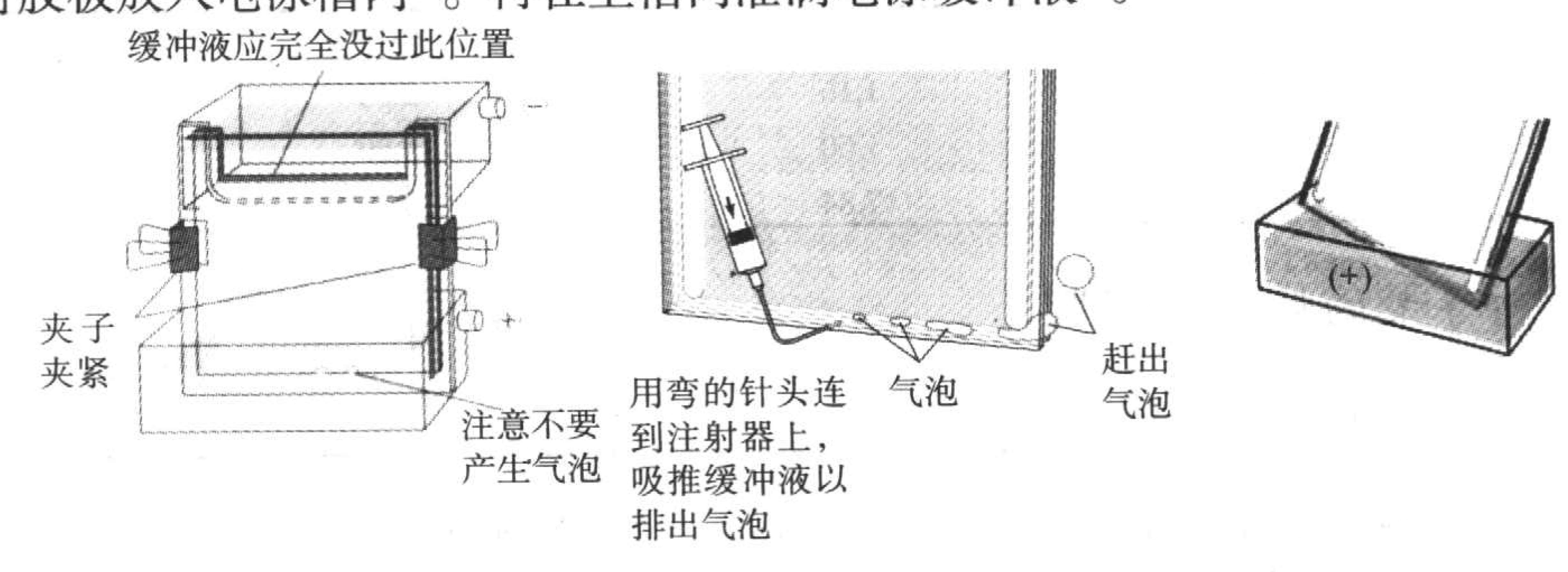
↓

ⓓ 凝胶凝固后拔出梳子，用双蒸水冲洗凝胶孔[e]。

↓

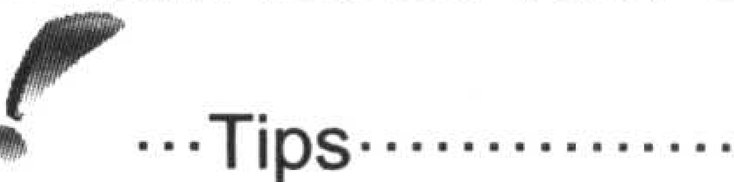
ⓔ 先在下槽内灌入电泳缓冲液，取下胶板里的橡胶条[f]。然后将胶板放入电泳槽内[g]。再在上槽内灌满电泳缓冲液[h]。

c. 长时间存放10×TBE，可能产生盐析现象。建议配制5×TBE储液，因此，按以下比例添加：
5×TBE　2 μL
双蒸水　5.6 μL
d. APS可配10%母液，在10 mL凝胶溶液中加100 μL。固体APS完全溶解后，再加TEMED。
e. 孔中若存在凝胶碎片或胶状悬浮物，则难以上样，如不冲洗掉，则影响带形。
f. 不拔出橡胶条，不能通电流。
g. 将胶板一面先插入缓冲液中，则不易产生气泡(下图)。
h. 只要不干胶，这样可放置过夜。

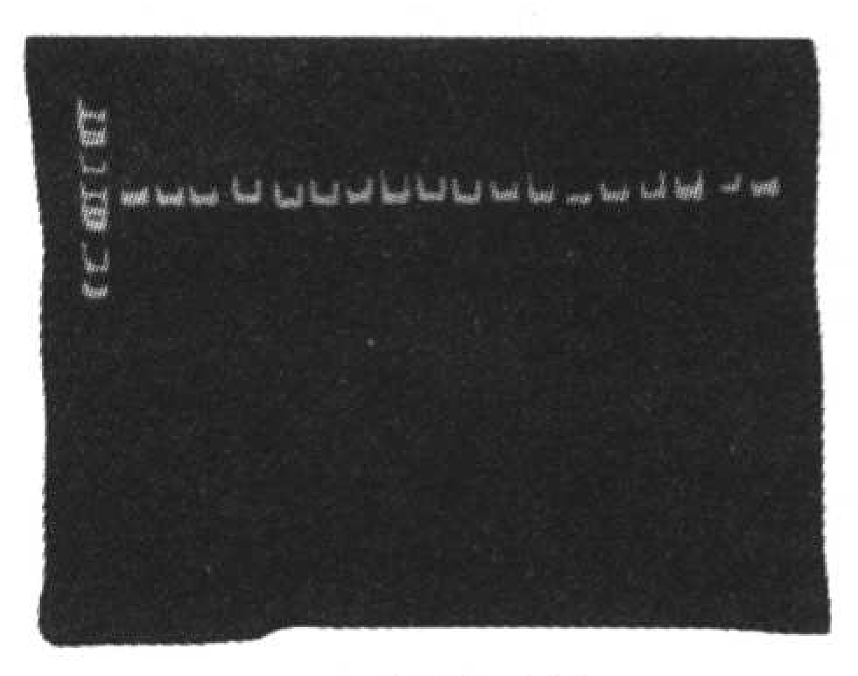


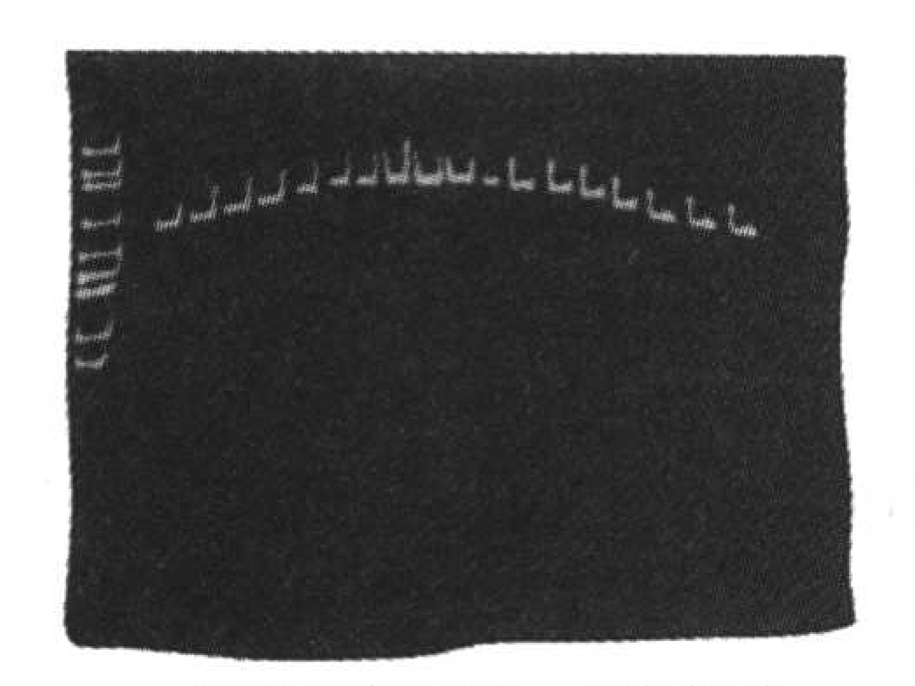
↓

ⓕ 按标记连接导线，上部接阴极(黑色)，下部接阳极(红色)，电泳。



胶板侧部用夹子夹紧，使之封闭严密。若上部密封不好，缓冲液将渗漏进去，而且渗漏部分可能产生电流，导致泳动方向紊乱，图谱呈弯月形。


正常的电泳


侧部有渗漏发生，使上部电泳缓冲液变少，图谱呈弯月形

4. 电泳操作

Materials

(1) 电泳仪

(2) 点样缓冲液

(3) 10×TBE 电泳缓冲液(附录一)

Protocols　　Time：1 h

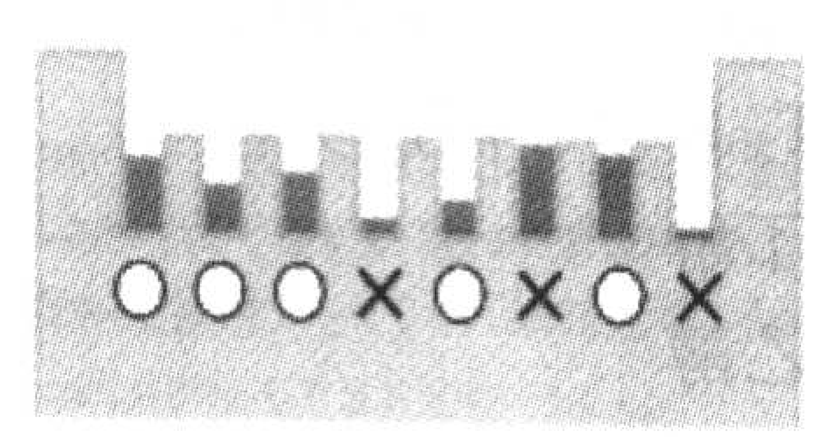
ⓐ 恒压 100 V 预电泳 15~30 min[a]。

↓

ⓑ 样品 DNA 与点样缓冲液按 5∶1 比例混合。

↓

ⓒ 停止电泳，再次冲洗点样孔，上样[b,c]。



上样量宜为孔的一半或 80%高度。106 mm×100 mm×1 mm、14 孔的凝胶，上样量为 10~20 μL。为了得到漂亮图谱，可用含少量电泳缓冲液的 TE 补齐各样品至一定体积

↓

ⓓ 恒压电泳[d]。

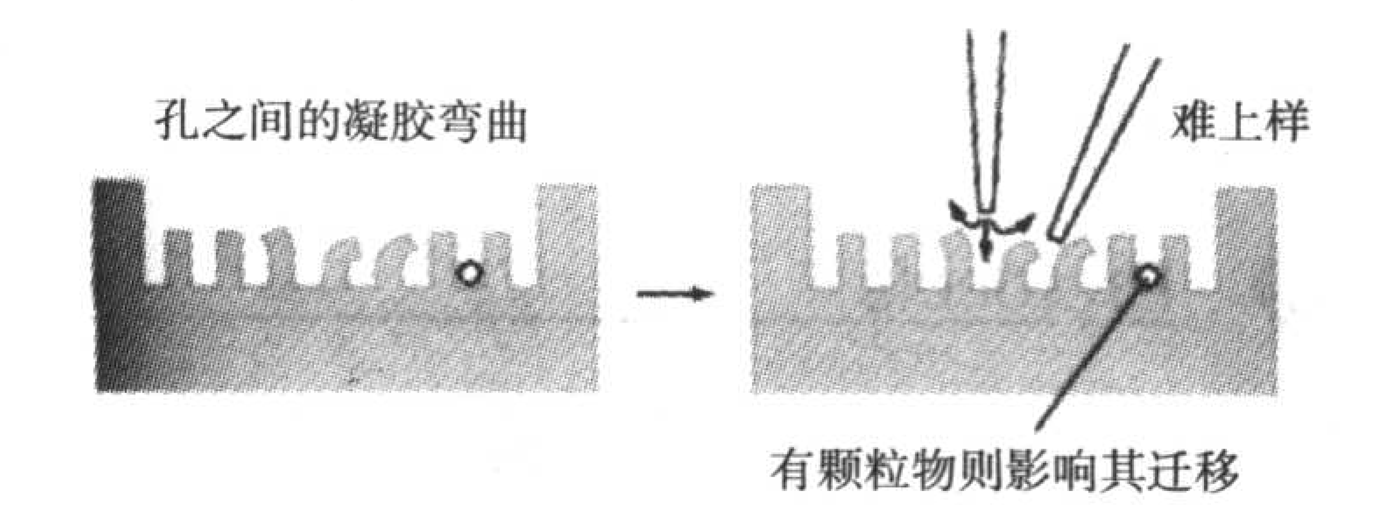
↓

ⓔ 溴酚蓝迁至约 2/3 位置处，则停止电泳[e]。

a. 在预电泳中电泳介质中的 APS 或 TEMED 将被迁移出去，保证了纯度。此外，预电泳也保证了凝胶状态均一。

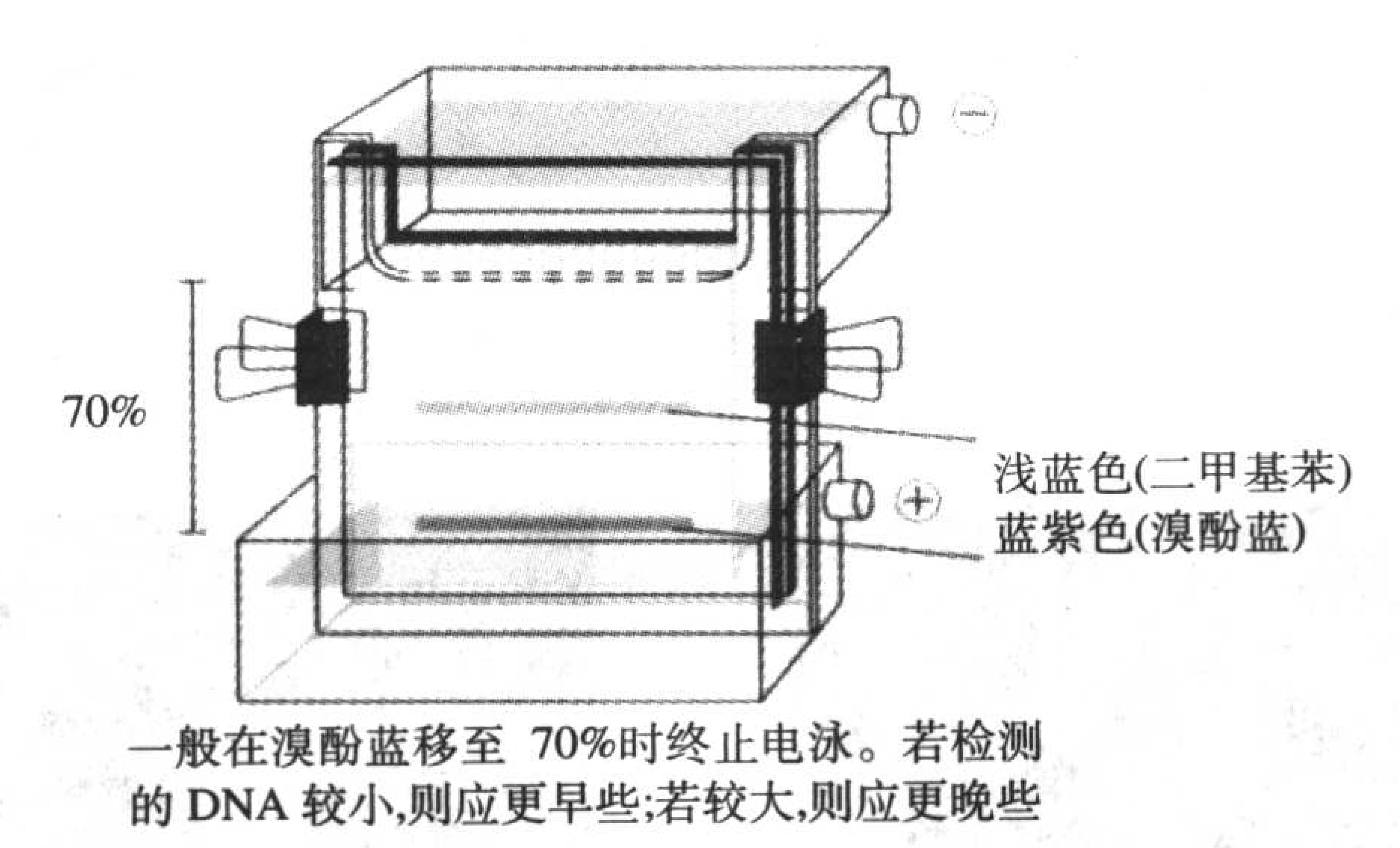
b. 聚丙烯酰胺电泳可检测到 1~20 ng DNA 量。适宜样品量为 1~10 μL，样品量过少，则电泳带不清晰；过多，可能挤到邻近泳道中去。上样量因孔的大小而异(左图)。

c. 点样孔凝胶弯曲(下图)，样品可能跑到邻近泳道内，带形变宽。若上样孔变形，可用针头等细物拨正。



d. 聚丙烯酰胺凝胶用 80~100 V 电泳 1 h。

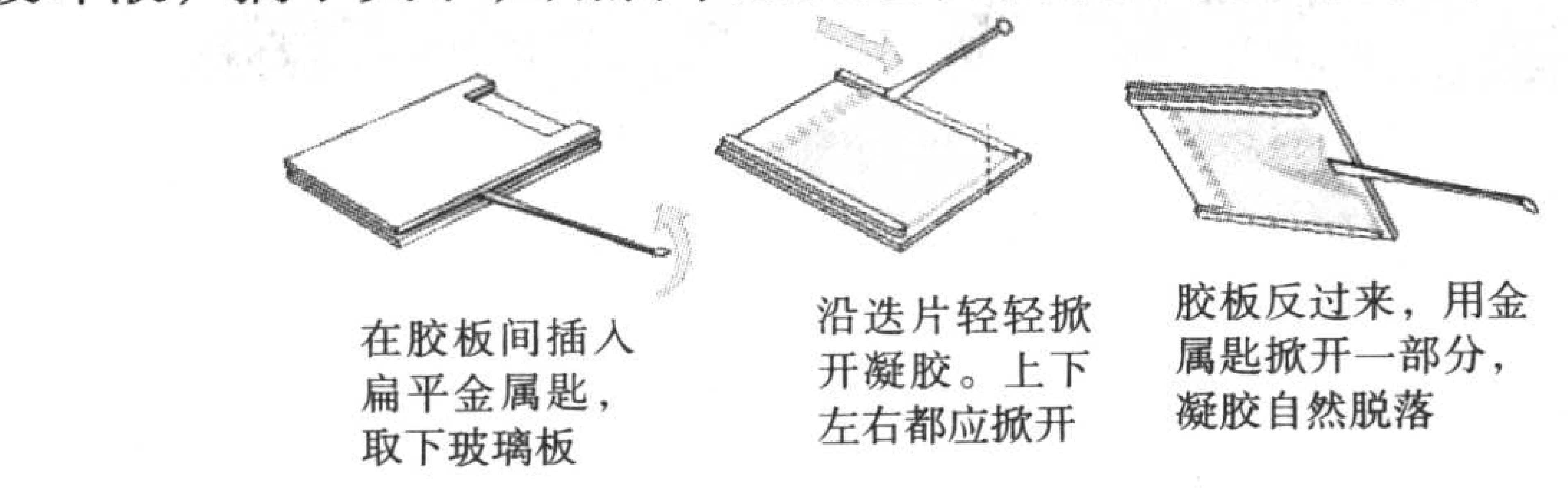
e. 终止电泳的时间取决于待测 DNA 的大小。DNA 分子质量小则早，DNA 分子质量大则晚。



一般在溴酚蓝移至 70%时终止电泳。若检测的 DNA 较小,则应更早些;若较大,则应更晚些

↓

ⓕ 倒掉电泳缓冲液，摘下夹子，用扁平金属匙轻轻掀开玻璃板，取下凝胶(下图)。



↓

ⓖ 凝胶浸于 EB 染色液中。

↓

ⓗ 仔细清洗胶板，晾干，备用。

第五节　从聚丙烯酰胺凝胶中回收 DNA

除下述方法外，还可用透析袋等方法回收 DNA，具体参见琼脂糖凝胶电泳回收 DNA 方法(本章第三节)。

Materials

(1) 小型离心机
(2) 旋涡混合器或振荡器
(3) 玻璃棒
(4) PP 材质的层析柱(Bio-Rad 公司)
(5) TE
(6) $T_{50}E$
(7) Sephadex G-25(优级纯)：事先悬浮于 $T_{50}E$ 中，高压灭菌
(8) 丁醇
(9) 乙醇
(10) 乙醚

Protocols　　Time：5 h

ⓐ 切下目的 DNA 带，装入离心管[a]。

↓

ⓑ 用玻璃棒杵凝胶。

↓

凝胶碎片

玻璃棒
捣碎凝胶
凝胶碎片

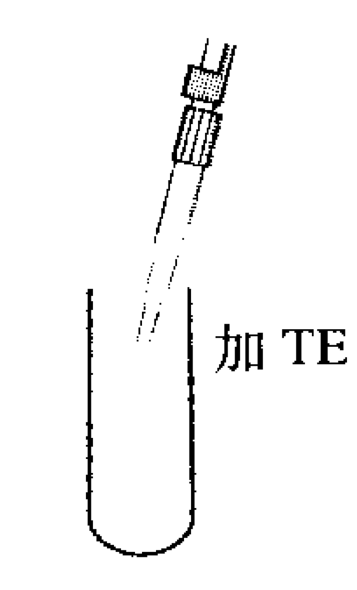
a. 选择口径大的离心管。

玻璃棒
离心管
选择玻璃棒能伸到底部的离心管

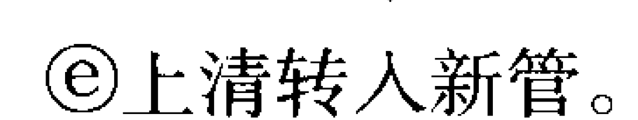
ⓒ 加 5~10 倍体积量(正常为 500 μL)TE，室温下振荡 30~60 min。

↓

ⓓ 5000 r/min 离心 3 min。



↓


ⓔ上清转入新管。

↓

ⓕ 重复ⓒ~ⓔ步操作。

↓

ⓖ 离心上清(5000 r/min、3 min)，去掉残留凝胶，上清移入新管。

↓

ⓗ 加丁醇至 50 mL，浓缩水分。

↓

ⓘ 在层析柱中加 1.5 mL 用 $T_{50}E$ 平衡好的 Sephadex G-25。

↓

ⓙ 浓缩的 DNA 溶液加在层析柱上，加 400 μL $T_{50}E$。打开夹子，回收流出的液体。待液面接近 Sephadex G-25 界面时，再加 200 μL $T_{50}E$，反复操作多次。流出的液体分装于不同管中。

↓

ⓚ 测各管溶液的 A_{260} 值，以确定保留哪一管回收液。

↓

ⓛ 乙醚抽提，回收 DNA 溶液。

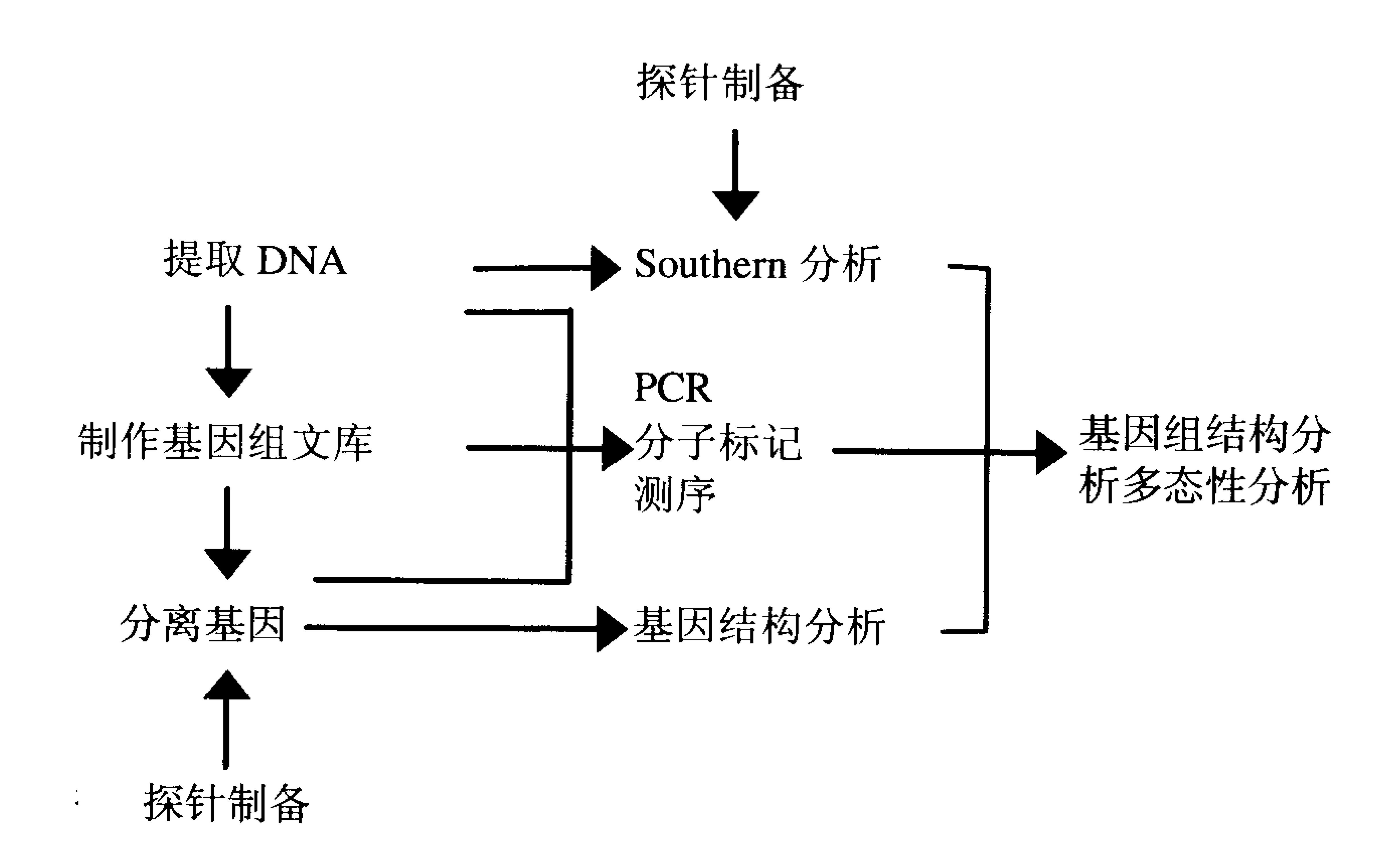
↓

ⓜ 乙醇沉淀 DNA。沉淀溶于合适缓冲液中，该 DNA 可直接用于连接反应。

…Questions………………

1. 简述琼脂糖凝胶电泳的基本原理。
2. 用琼脂糖凝胶电泳检测质粒 DNA 时，其图谱如何？DNA 高级结构对电泳迁移有何影响？
3. 从琼脂糖凝胶中回收 DNA，有哪些主要方法？其原理各是什么？哪一种方法最简单？
4. 简述聚丙烯酰胺凝胶分离 DNA 的原理。配制聚丙烯酰胺凝胶时，为什么要加入 N, N, N', N'-四甲基乙二胺和过硫酸铵？
5. 电泳中有哪些原因导致 DNA 带型重影？
6. 如何通过琼脂糖凝胶电泳测定样品中目的 DNA 的浓度？

第二篇　DNA 篇

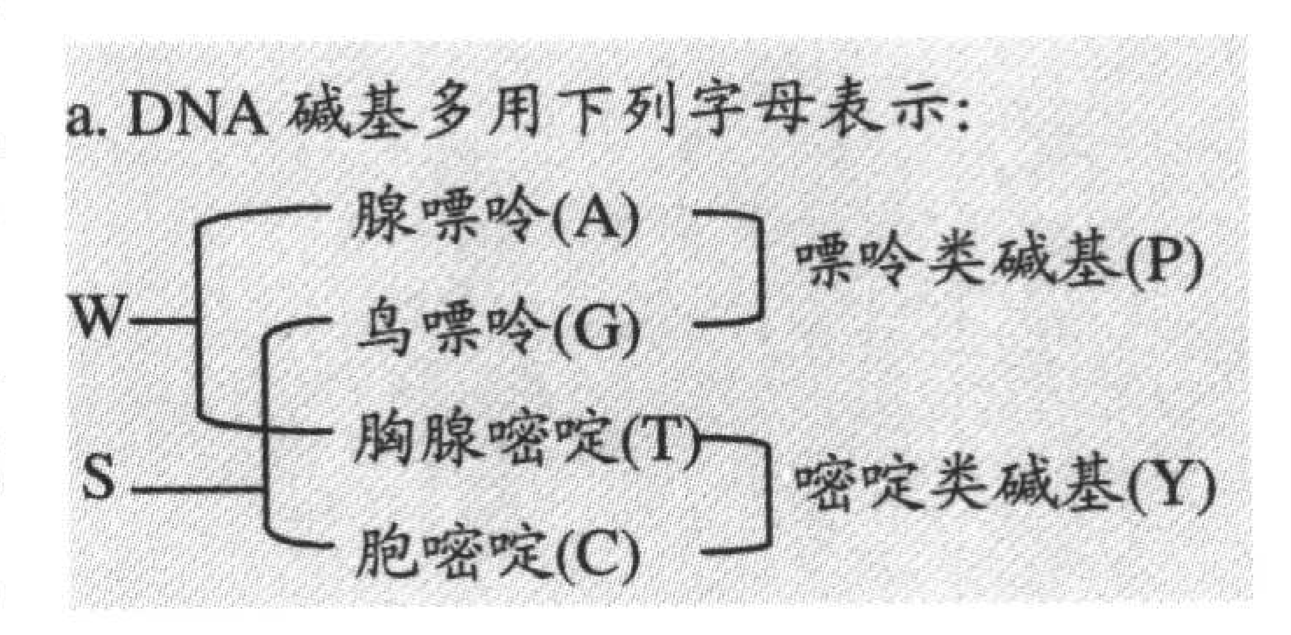

探针制备
提取 DNA
Southern 分析
制作基因组文库
PCR
分子标记
测序
基因组结构分
析多态性分析
分离基因
基因结构分析
探针制备

第六章　DNA 基本操作

核酸分 DNA(deoxyribonucleic acid，脱氧核糖核酸)和 RNA(ribonucleic acid，核糖核酸)两种。DNA 通常为双链，线状双链 DNA 简写成 l DNA，开环双链 DNA 简写成 ocDNA，闭环双链 DNA 简写成 cccDNA(或 ccDNA)。RNA 通常为单链，但也可能存在分子内双链结构。DNA 以脱氧核糖、碱基及磷酸基团组成的核苷为基本单位，相互间通过磷酸二酯键连接。脱氧核糖的 3′ 位和下一个脱氧核糖的 5′ 位组成线性分子(图 6-1)。

图 6-1　DNA 结构

DNA 碱基包括嘌呤类的腺嘌呤(A)与鸟嘌呤(G)，及嘧啶类的胸腺嘧啶(T)与胞嘧啶(C)[a]。RNA 不含胸腺嘧啶而含尿嘧啶(U)。P(嘌呤类碱基)与 Y(嘧啶类碱基)在 DNA 中的比例永远是 1∶1，但 W(A+T)与 S(G+C)的比例视 DNA 种类而异。S 碱基的亲水性强，因此 GC 含量高的 DNA 不易变性。



第一节　DNA 保存

DNA 在如下条件下较稳定：

(1) 中性 pH。

(2) 低温。

(3) 暗处(避免紫外线)[a]。

a. 强力振荡或高速转动 DNA 溶液易切碎 DNA，尤其是高分子质量 DNA。浓 DNA 因黏度高而难溶解，但长时间也能很好地使它溶解于水中。紫外线易损伤 DNA，这点尤应注意。

(4) 合适盐浓度(如 100 mmol/L NaCl)。

(5) 无物理剪切[a]。

在 DNA 操作中，应防止 DNA 降解酶对 DNA 的消化。大部分 DNA 降解酶作用时，需要二价阳离子(如 Mg^{2+}、Ca^{2+})。如果溶液中存在金属离子螯合剂，就能有效地抑制降解酶的消化反应，很好地保存 DNA。一般使用的螯合剂为 EDTA(乙二胺四乙酸)。此外，也应注意避免因污染物(来源于细菌或溶液)而混入 DNA 溶液中的 DNA 降解酶。

有三种缓冲液可用于溶解或保存 DNA：

(1) TE [$T_{10}E_1$：10 mmol/L Tris・HCl (pH8.0)，1 mmol/L EDTA (pH8.0)]；

(2) 0.1×TE(用于酶促反应)；

(3) $T_{50}E$ [$T_{50}E_1$：50 mmol/L Tris・HCl (pH8.0)，1 mmol/L EDTA (pH8.0)。用于溶解 pH 不稳定的 DNA]。

第二节　DNA 检测

1. 紫外吸收

DNA 能很好地吸收 260 nm 附近的紫外光，因此可用紫外吸收的方法测定 DNA 浓度。1 μg/mL DNA 溶液在 260 nm 波长下的吸光值(A_{260})为 0.02，RNA 的 A_{260} 值是 DNA 的 1.25 倍。这些数据是在碱基分布均匀时测定的，当碱基组成有偏离时(如寡聚体或引物等)，需要重新测定[a]。

分光光度计是对溶液发光，测定溶液光吸收程度的装置，其类型多种多样，测定原理都基本相同。DNA 浓度可用分光光度计来测定。

a. 各寡聚体浓度为 1 μg/mL 时，A_{260} 值为 dG=0.035，dC=0.022，dA=0.046，dT=0.026。一般而言，寡聚物量(μmol)=寡聚体 A_{260} 值/(10× 核苷酸长度)，简单地表示为 $1A_{260}$≈33 μg/mL，但浓度计算公式应是：寡聚体浓度(pmol/μL)=A_{260}× 100/($1.5N_A+0.71N_C+1.20N_G+0.84N_T$) ($N$ 是各核苷酸的个数)。

Protocols　　　　Time：1 h

ⓐ 打开电源开关，并将紫外灯(氘灯)激活，待稳定后，将波长调至 260 nm[a]。

↓

ⓑ 用镜头纸擦拭测定杯外侧，加入溶剂(0.1× TE 或水)至规定量，将该吸光值设为零。

↓

ⓒ 取出测定杯，充分弃去杯内溶剂后，加入 DNA 溶液。若样品富余，最好先用样品涮洗一下测定杯内侧。

↓

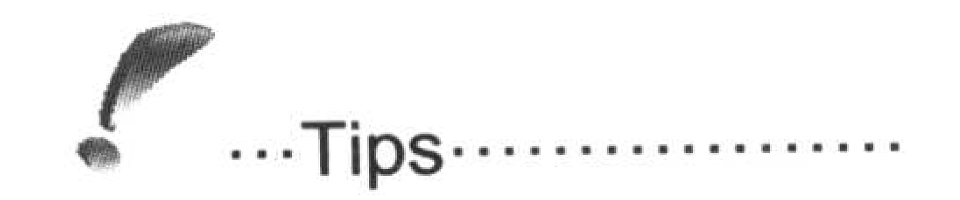
ⓓ 测吸光值。DNA 溶液若还用于其他实验，应注意回收[b]。

↓

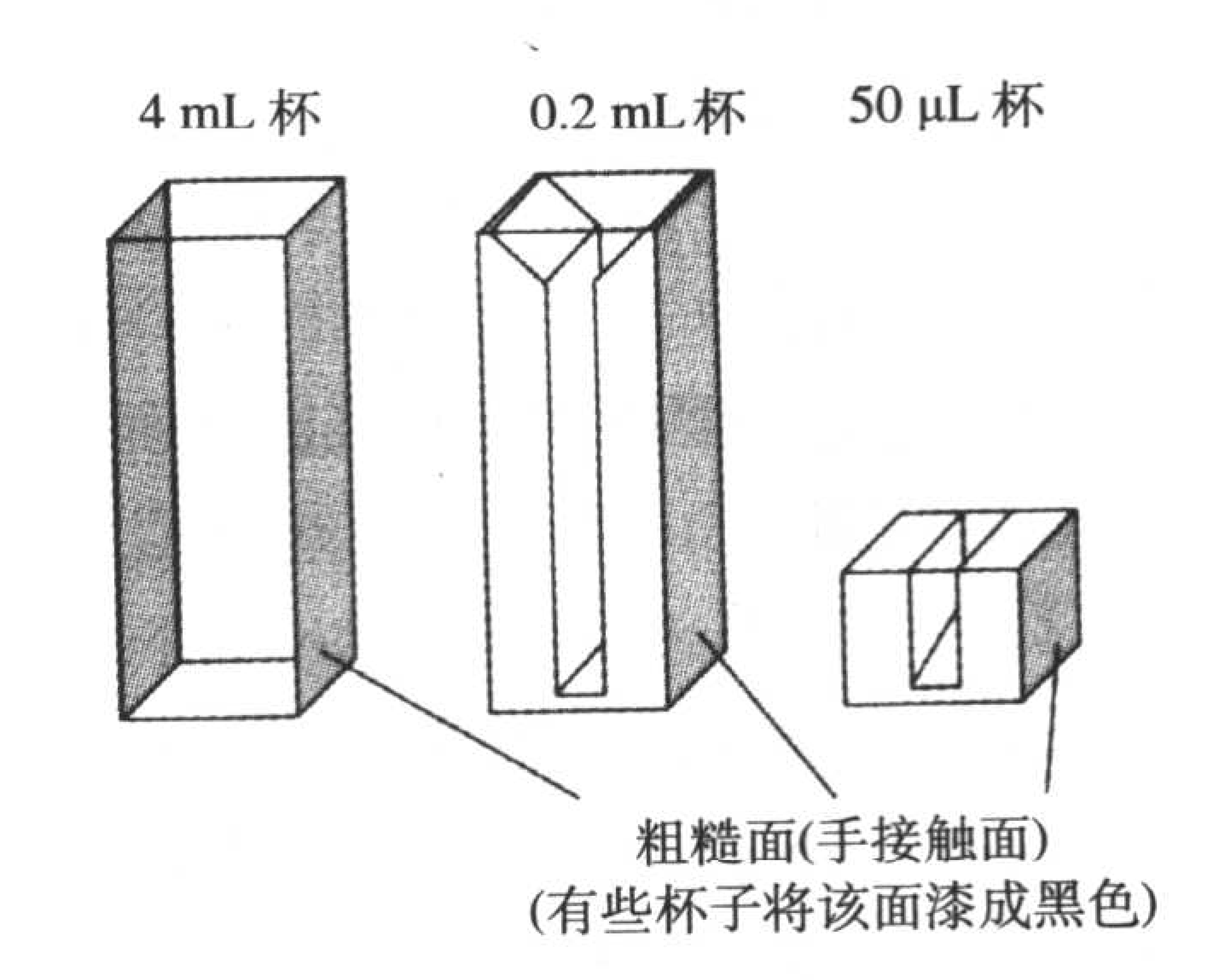
ⓔ 计算 DNA 浓度(μg/mL)=50×A_{260} 值。

a. 氘灯有寿命限制，不用时应关闭。

b. 有多个待测样品时，反复按ⓓ→水洗→ⓒ→ⓓ操作。各样品浓度有差异时，先测低浓度样品。



紫外线不能透过普通玻璃，因此紫外光照射面用石英制成。测定杯容易坏，且昂贵，应小心使用，做到轻拿轻放。4 mL 比色杯是标准杯，此外还有 1~0.2 mL 微量比色杯、50 μL(或 5 μL)超微量比色杯。杯内若被弄脏，应先将其浸泡于中性洗涤剂中，然后用柔软纸巾擦拭。比色杯不用时，通常浸泡于 50%乙醇溶液中(也可添加少量的盐酸)，或干燥保存。



2. 溴化乙锭

溴化乙锭，通常写成 EB[a]，结合于双链 DNA 的 EB 被紫外线照射时可产生橙色荧光，因此可用于 DNA 检测，常用 EB 的浓度为 0.5 μg/mL。如图 6-2 所示，目测比较已知 DNA 溶液的荧光强度与待测 DNA 样品的荧光强度的差异，即可推测出待测 DNA 样品的浓度。

a. EB 具有致癌性，操作时应戴手套。EB 与氯结合后即失去致癌性(变成无色溶液)，因此将要废弃的 EB 用次氯酸钠溶液处理成无色后才可倒入下水道，或参见附录一介绍的 EB 溶液净化处理方法。

电泳后的凝胶通常浸泡于 EB 溶液中 15 min 即染色完毕。氯化铯密度梯度离心时使用的 EB 浓度为 0.1 mg/mL。

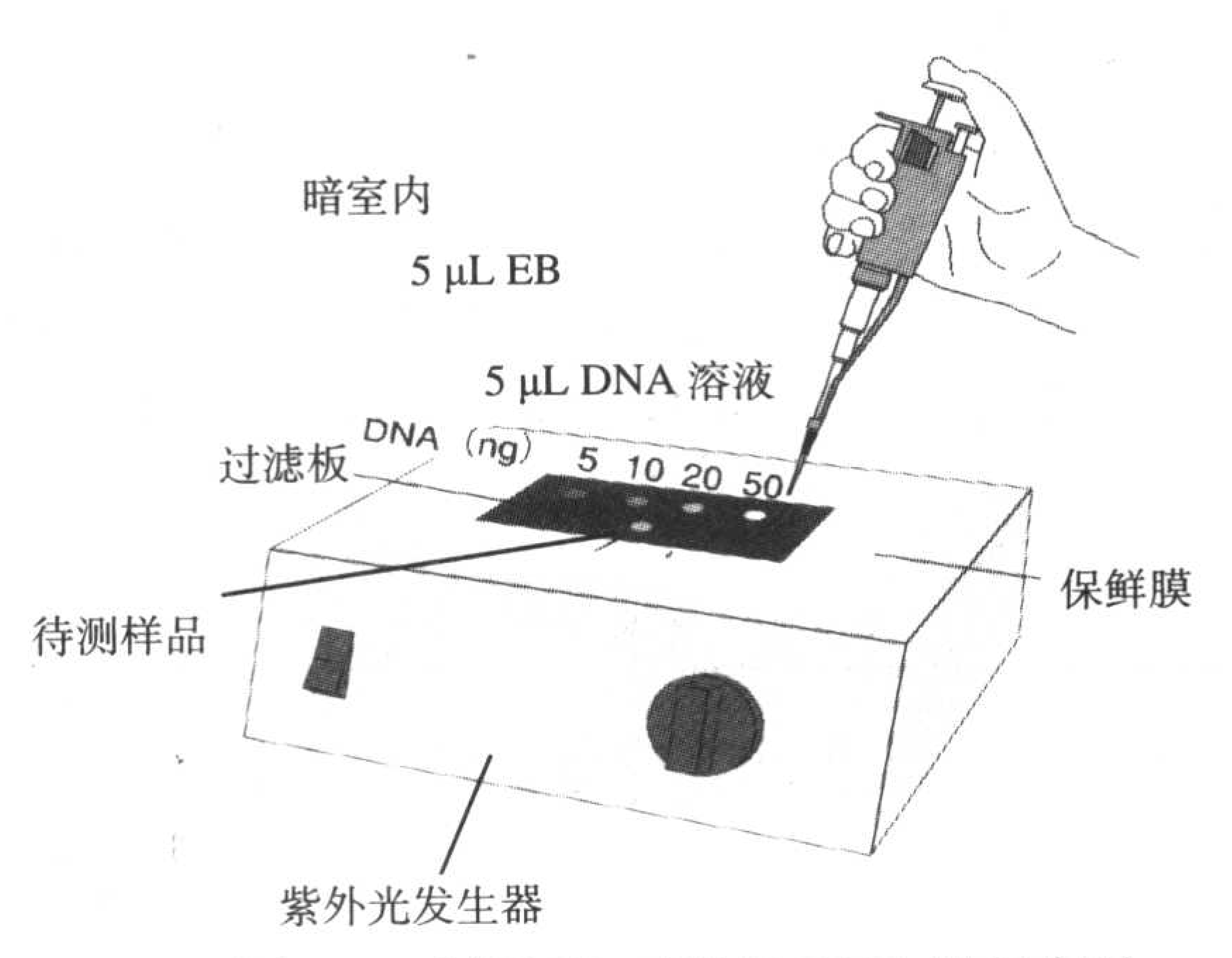


图 6-2 利用 EB 对微量 DNA 进行定量

在暗室内操作，紫外光发生器上方铺上一层保鲜膜，然后滴上 5 μL EB/点，再滴上浓度已知的待测样品，混合，打开紫外线发生器开关，比较荧光强度的差异，推定待测样品 DNA 浓度

第三节 DNA 浓缩

1. 乙醇沉淀

DNA 不溶于乙醇，因此可用乙醇来沉淀 DNA，以达到纯化 DNA 的目的。乙醇沉淀是浓缩 DNA 的常用方法。

Materials

(1) 冷冻离心机
(2) 离心干燥机
(3) 3 mol/L NaAc (pH5.2) (附录一)
(4) 预冷的 70%乙醇[a]
(5) 预冷的 100%乙醇[a]

a. 盛于 100~500 mL 玻璃瓶中，置于–20℃冰箱中预冷。用双蒸水稀释 100%乙醇的方式配制 70%乙醇(在 70 mL 乙醇中加双蒸水至 100 mL 刻度)。

Protocols　　Time：2 h(到最终的 DNA 溶解步骤)

ⓐ 按 DNA 溶液量的 1/10 体积加入 3 mol/L NaAc[b]。

↓

ⓑ 加 2.5 倍体积的预冷 100%乙醇，盖上盖子振荡充分混匀。

↓

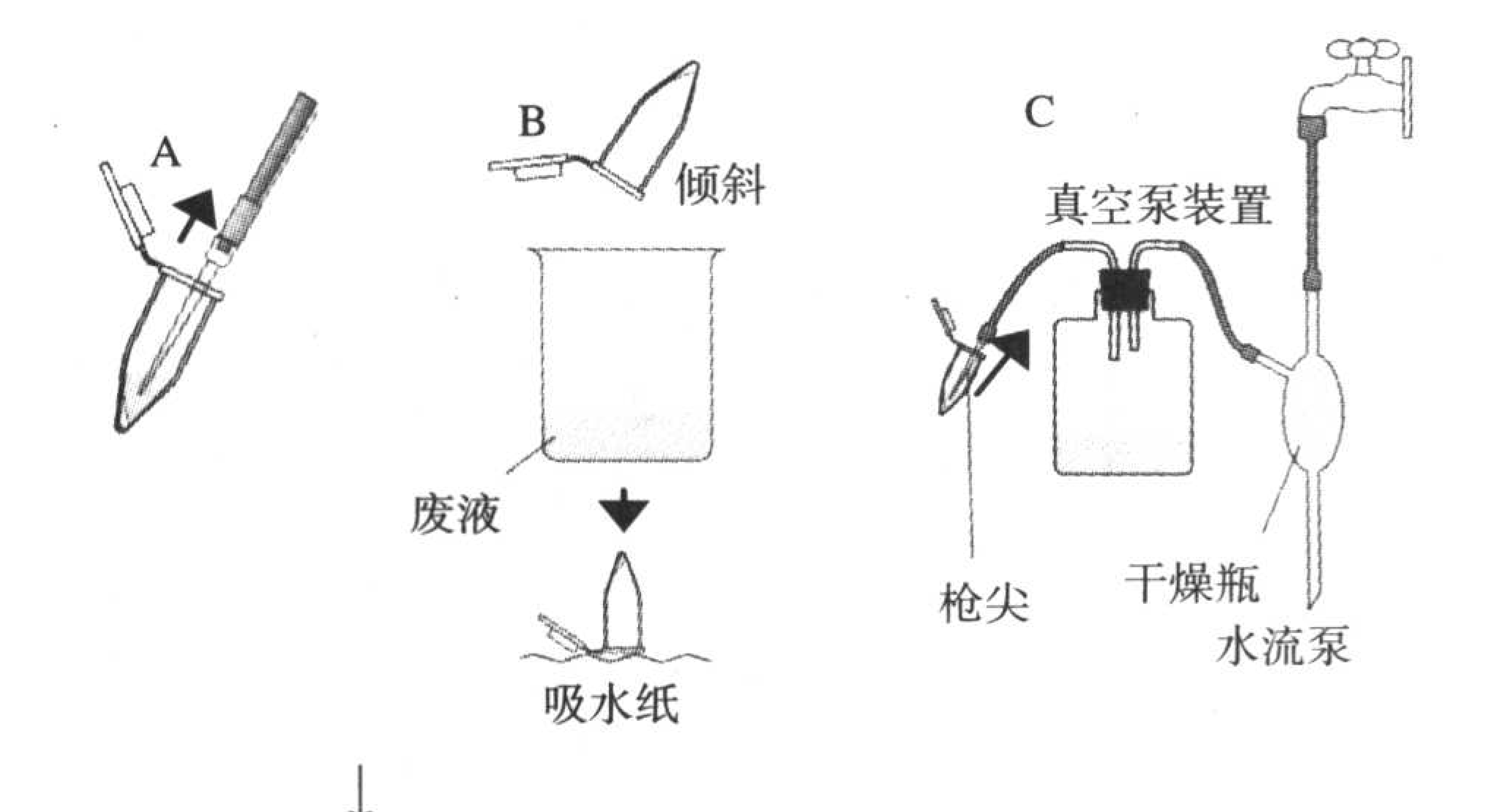
ⓒ –70℃下静置 15 min 或–20℃下静置 1 h 以上。

↓

ⓓ 4℃、15 000 r/min 下离心 15 min，沉淀 DNA[c]。

↓

ⓔ 用移液器或其他装置弃去上清(下图)，注意不要弃去沉淀[d]。

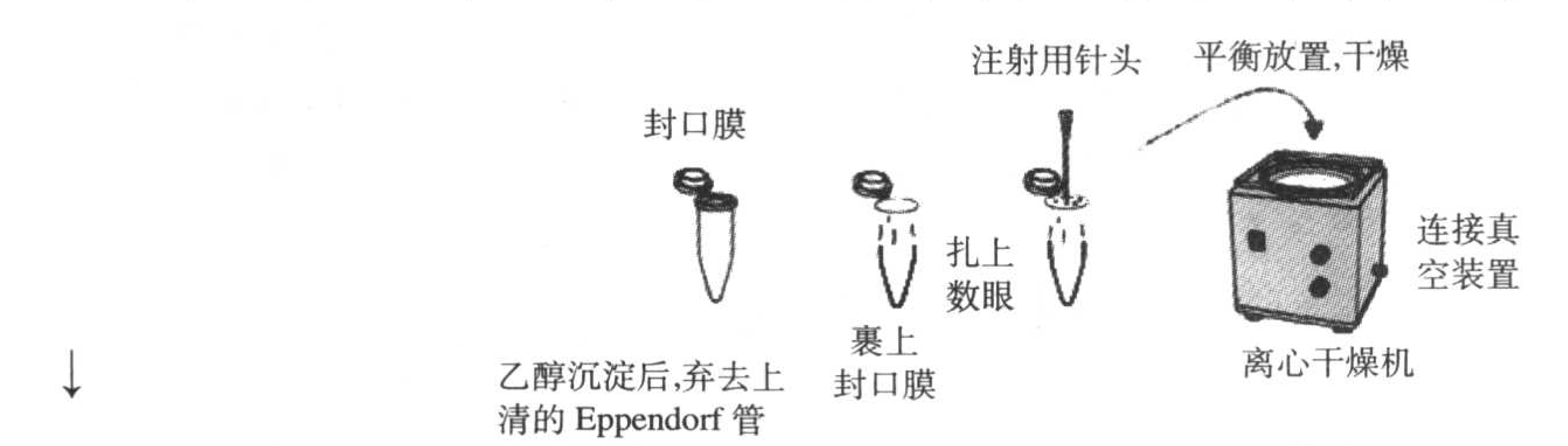


↓

ⓕ 加 70%乙醇适量，漂洗沉淀，再次离心[e]。

↓

ⓖ 如下图所示，用封口膜封口后，在膜上扎数个小孔，用离心干燥机干燥 10~30 min。



↓

b. 盐能中和核酸上的电荷，因此容易使 DNA 沉淀。常用 NaCl 或钾盐。加入过多的盐易产生盐析。RNA 微带酸性，因此用 NaAc 或 KAc (pH6.0)。为去除小于 50 bp 长的核酸，常使用终浓度为 0.7~2 mol/L 的 NH_4Ac(储液浓度为 7.5 mol/L，不能用高温高压方式灭菌)。

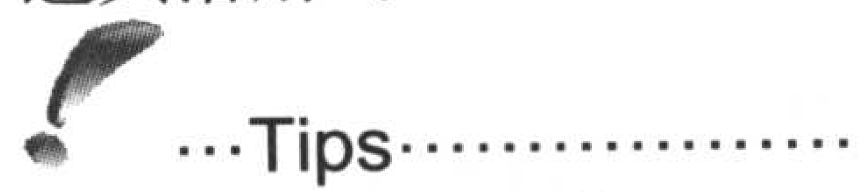
c. 冷却及离心条件依 DNA 浓度而定。乙醇沉淀 DNA 应保证其浓度在 1 μg/mL 以上，低于此浓度，则应进行超速离心。若 DNA 浓度很高，目测能看见白色沉淀，则 3000 r/min 离心速度就可达到回收的目的。

d. 倾斜后迅速倒置于纸巾上(左图 B)。在真空泵吸嘴上装上枪尖以吸走上清(左图 C)。

e. 沉淀易滑落掉，因此弃上清时应特别小心。漂洗的目的是为了去除样品中的盐分。

ⓗ 加适量 TE 溶解沉淀。可用低速旋涡混合器以加速其溶解[f]。

f. 质粒 DNA 及低分子质量 DNA 可用旋涡混合器混匀。DNA 量多则溶解慢，耗费时间长。高分子质量基因组 DNA 易断裂，应避免使用过激的搅拌方式，用一天时间使其缓慢溶解。



浓度稀或短小的 DNA，难以沉淀，可以加些帮助其沉淀的酵母 tRNA 或糖原(多糖化合物)等辅助载体，辅助载体的浓度通常为 50 μg/mL。辅助载体应不影响以后的实验，如 TaKaRa 公司的 DNAmate(一种乙醇沉淀的共沉剂)。

2. 异丙醇沉淀

除乙醇外，也可用沉淀能力更强的异丙醇来沉淀 DNA。异丙醇加入量通常为 DNA 溶液的 0.6~1.0 倍(*V*∶*V*)。因加入的异丙醇体积比乙醇更小，因此异丙醇显得更方便。异丙醇沉淀操作与乙醇沉淀操作完全类似。但由于异丙醇难挥发，沉淀后的漂洗则不能使用异丙醇，而改用 70%乙醇。

3. 有机溶剂浓缩 DNA

乙醇或异丙醇沉淀 DNA，要求 DNA 有一定浓度，浓度越低，回收率越低。若想从非常稀的 DNA 水溶液中除去水分以浓缩 DNA，则常用一些有机溶剂，如正丁醇。

Protocols　　　　Time：15 min

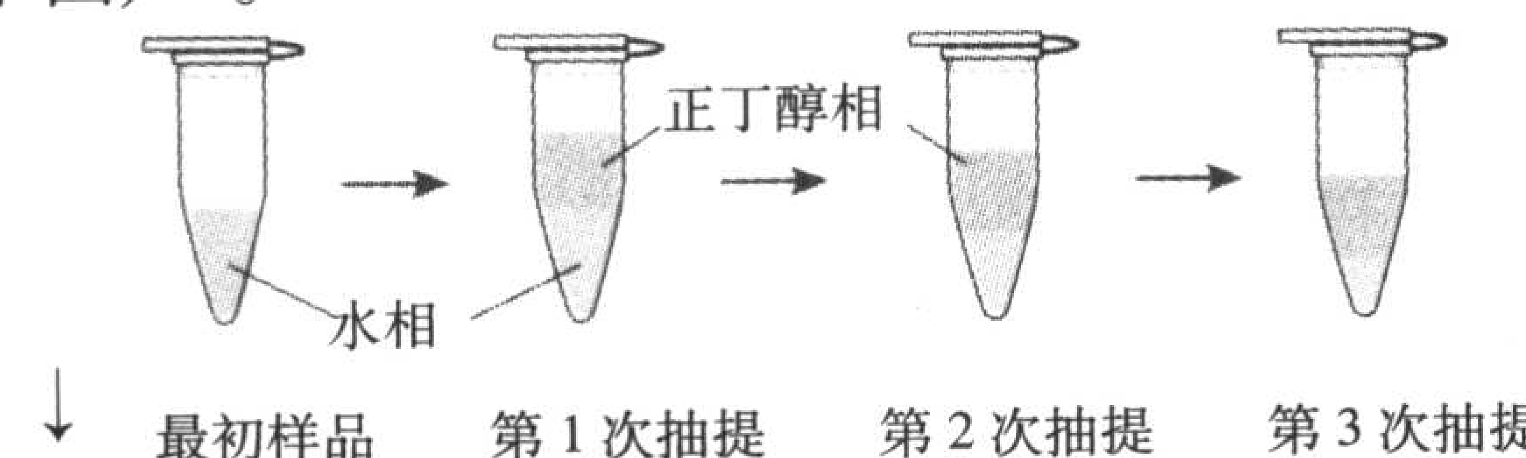
ⓐ 加入与 DNA 样品等体积的正丁醇，用力振荡 5 s[a]。

↓

ⓑ 低速离心[b]，弃去上清(有机溶剂相)。

↓

ⓒ 加与水相等体积的正丁醇，重复ⓑ操作，使样品量浓缩到希望量(下图)[c,d]。



↓

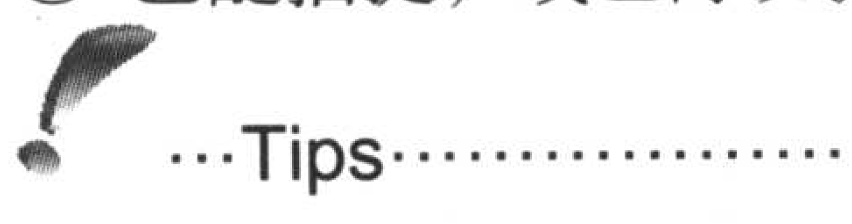
ⓓ 乙醚抽提，或乙醇沉淀，去除正丁醇。

a. 盖严盖子，用力振荡。

b. 用离心机轻甩即可。

c. 第 2 次离心后，溶液体积通常将减少一半。若见不到水相，可加少量水并充分搅拌，DNA 将又回到水相。

d. 包括盐或缓冲液等成分全被浓缩，因此以后所进行的酶促反应需特别注意。



乙醚能去除各种有机溶剂，但因其极易燃烧而更加危险，因此操作务必在通风橱中进行。

DNA 样品可加少量水保存于冰箱中，按上述方法用乙醚抽提 3~4 次可有效去除有机溶剂。残存的乙醚可用吸管吹气除去，要想更彻底除尽残存的乙醚，可于 60℃下放置 10~30 s。

第四节　DNA 纯化

DNA 纯度低，酶促反应则不能有效进行，此时需对 DNA 进行纯化处理，这个过程

叫 DNA 纯化。导致 DNA 纯度低的最主要原因是蛋白质污染。若 A_{260} 值是 A_{280} 值的 1.8 倍以下，应怀疑 DNA 样品中混入了蛋白质杂质，可用酚抽提方法除去。从噬菌体、植物或动物组织中提取 DNA 还容易混入多糖类物质，此时可用吸附剂或超速离心等方法除去多糖。多糖也会抑制酶促反应。

1. 酚抽提

蛋白质在酚中变性成不溶性物质，利用该特性去除蛋白质杂质。

1) Tris 饱和酚的配制

国内试剂公司有结晶酚或 Tris 饱和酚销售，可直接购买。若发现购买的酚呈褐色，则应停止使用。褐色酚重蒸馏后可继续使用。酚腐蚀性极强，操作时应戴上手套，若不小心沾到皮肤上，极易导致烫伤，这时尽快使用流水和肥皂水(起中和作用)冲洗污染处。

Materials

(1) 结晶酚

(2) 8-羟基喹啉

(3) 1 mol/L Tris · HCl(pH8.0) (附录一)

Protocols　　Time：3 h

ⓐ 将盛有结晶酚的瓶子置于 70℃水浴锅中，以熔化结晶酚。

↓

ⓑ 将熔化的液态酚转入细长、带盖的容器中，加 8-羟基喹啉[a]至终浓度 0.1%。

a. 8-羟基喹啉能抑制溶液内的氧化反应。添加 8-羟基喹啉的 Tris 酚溶液呈黄色，若变褐，则应停止使用。

↓

ⓒ 加等体积的 1 mol/L Tris · HCl，盖上盖子，颠倒振荡 10 min(振荡 1~2 次/s)，使之混匀。

↓

ⓓ 静置后用玻璃吸管将上层水相移走(右图)，此时 8-羟基喹啉(黄色)转移到酚相中。

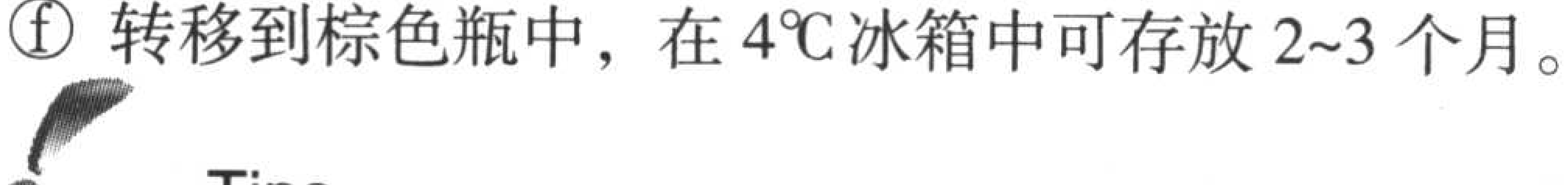
↓

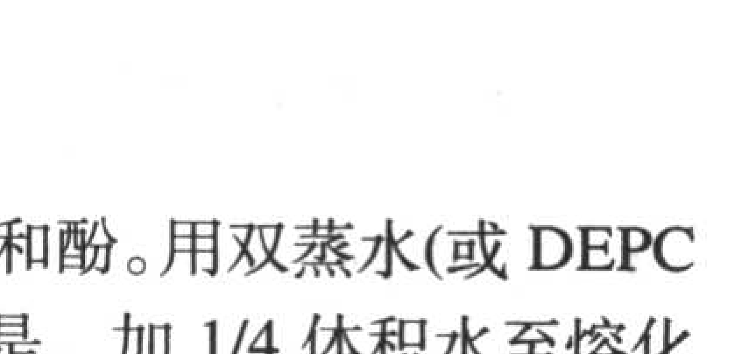
ⓔ 再次用 1 mol/L Tris ·HCl(pH8.0)振荡 10 min，最后留一薄层水相。

↓

ⓕ 转移到棕色瓶中，在 4℃冰箱中可存放 2~3 个月。

水相
苯酚相





…Tips………………

Tris 饱和酚用于 DNA 实验。RNA 因带弱酸性，因此 RNA 实验应使用水饱和酚。用双蒸水(或 DEPC 处理水)代替 Tris 缓冲液进行饱和处理即是水饱和酚。最省事的水饱和酚配制是，加 1/4 体积水至熔化的苯酚中混合即可。

2) 酚抽提实验

Materials

(1) 离心机

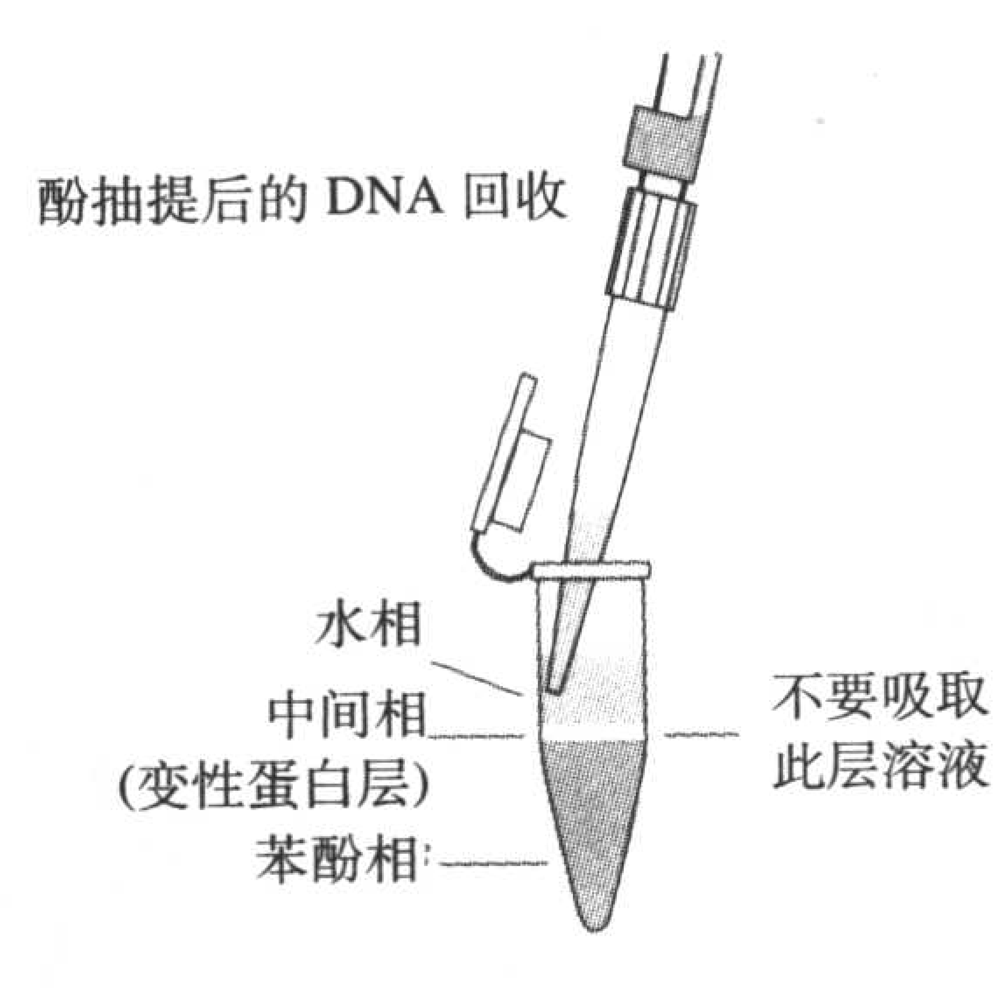
(2) Tris 饱和酚(附录一)

Protocols   Time：抽提 1 次需 30 min

ⓐ 在 DNA 样品中，加等量的温度升至室温的 Tris 饱和酚。用旋涡混合器搅拌，或用手颠倒方式剧烈振荡 30 s [b]。

↓

ⓑ 室温下、10 000 r/min 离心 5~15 min，将上清(水相)转移到新的干净 Eppendorf 管中。注意不要吸取中间的变性蛋白质 [c]。



↓

ⓒ 再次进行抽提，直至看不见中间变性蛋白层为止。

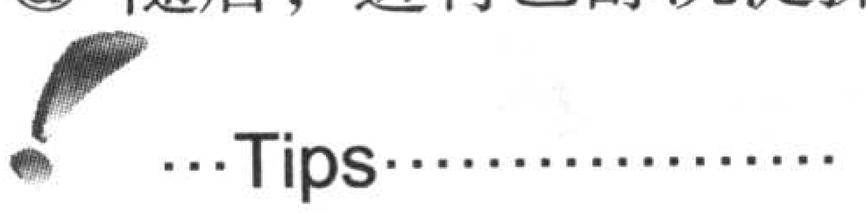
↓

ⓓ 随后，进行乙醇沉淀操作 [d]。

b. 振荡方式因样品而异。蛋白质多的样品需长时间(5~30 min)振荡。高分子质量 DNA 样品则用间隙式方式振荡数小时。若是 Eppendorf 管，可按每隔 3 s 轻轻振荡 1 次的方式进行。

c. DNA 溶液中若混入了水溶性的高比重物质(如高浓度蔗糖)，往往导致水相比重高于苯酚相，此时水相将在下层。应使用枪尖吸取 Eppendorf 管底部的底层溶液。苯酚相因含有黄色的 8-羟基喹啉，一眼就能看出它的位置。

d. 酚极易残存在水相中，因此乙醇沉淀操作应进行 2 次，或乙醇沉淀后应充分漂洗。若样品量少，最好用乙醚去除残留的酚。用氯仿也能将大量残留酚去除干净。



用酚抽提不能去除蛋白质时，可尝试在样品中加 NaCl 至 0.1 mol/L，或再加 SDS 至 0.5%后再进行酚抽提。若这样仍不能去除，可以考虑在样品中加蛋白酶 K 至 20 μg/mL，37℃下保温 30 min，再进行酚抽提。

2. 苯酚/氯仿/异戊醇抽提

在苯酚中添加氯仿/异戊醇，能改善抽提效果。

1) 试剂配制

在氯仿中加 1/24 体积比的异戊醇，该混合物简写成 CIA。CIA 与含 8-羟基喹啉的 Tris 饱和酚等体积混匀，静置后，盛于棕色瓶中，即是苯酚/氯仿/异戊醇溶液。苯酚/氯仿/异戊醇溶液保存于 4℃冰箱中，备用。

2) 使用方法

与酚抽提步骤完全相同，但氯仿易溶解聚苯乙烯材料制成的塑料制品，因此操作中不能使用聚苯乙烯制品。

3) 特性

尽管蛋白质在苯酚/氯仿/异戊醇溶液中的变性能力较 Tris 饱和酚有所下降，但完全能达到去除重组 DNA 实验中杂有的蛋白质杂质的目的[a]。

a. 苯酚和氯仿都有毒，且具有腐蚀性，因此接触的容器务必慎重处理。

3. DEAE/纤维素交换树脂

DNA 或 RNA 带负电荷，可吸附于阴离子交换树脂上，利用 DEAE/纤维素交换树脂能有效地将核酸及其他杂质分离开。

Materials

(1) DEAE/纤维素交换树脂(如 Whatman 公司的 DE52)
(2) 1 mL 蓝色枪尖和石英棉
(3) TE
(4) NaCl/TE：加有 0.5 mol/L NaCl[a] 的 TE

a. 1.0 mol/L NaCl 更有效，但随后的乙醇沉淀中易产生盐析现象，应注意。

Protocols　　Time：1.5 h

以数微克 DNA 溶于少量 TE 的样品为例。

ⓐ 在蓝色枪尖(1 mL)顶端塞上少许石英棉[b]，再加 100 μL DEAE/纤维素交换树脂(DE52)，制成纤维柱。

↓

ⓑ 用 300 μL TE 冲洗纤维柱[c]。重复操作 3 次。

↓

ⓒ 将过滤出的滤液再次加到纤维柱中，再将 DNA 样品加到纤维柱上，静置，使 DNA 样品充分浸入柱内。

↓

ⓓ 用 300 μL TE 冲洗纤维柱 2~3 次。

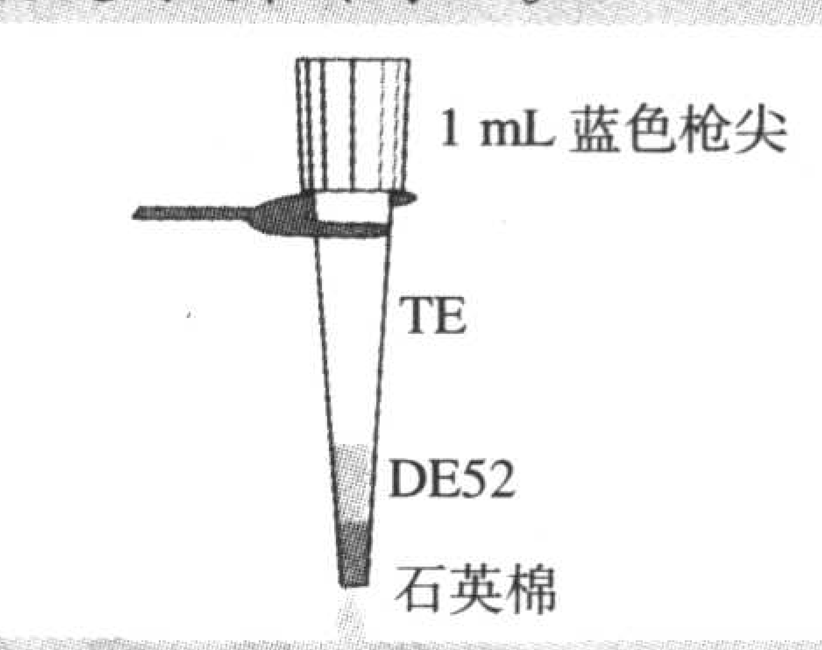
↓

ⓔ 用 100 μL NaCl/TE 洗脱 DNA。

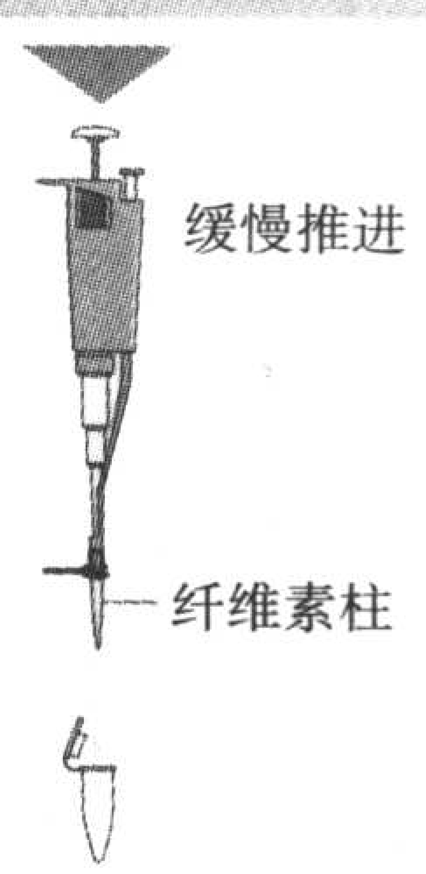
↓

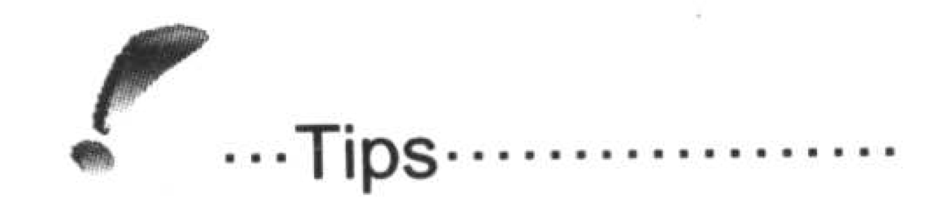
ⓕ 用乙醇沉淀方法浓缩 DNA。

b. 将米粒大的石英棉塞入枪尖顶端，用一个夹子将枪尖固定在架子上。



c. 最适流速为 1~2 滴/min。流速慢时可用微量移液器施加压力。





虽然原理不是很清楚，但经验告诉我们，乙醇沉淀前，用丁醇抽提一次，回收率显著提高。与DEAE/纤维素柱原理类似，也有应用吸附蛋白质的柱子回收DNA的试剂盒销售。也可使用更便宜的玻璃珠来替代石英棉吸附DNA。

4. 凝胶过滤

用于去除DNA样品中含有的盐、缓冲液组分、小分子物质等。

Materials

(1) 5 mL 微型柱(Bio-Rad公司)
(2) TE
(3) 用TE膨胀、高温高压灭菌的Sephadex G-25或G-50

Protocols　　　　Time：2 h

ⓐ 将预备好的Sephadex填充进5 mL微型柱，用2.5 mL TE冲洗2次[a]。

↓

ⓑ 在柱上部添加100 μL样品[b]。

↓

ⓒ 在柱上部再小心添加TE(约2 mL)，每2~5滴(1滴约50 μL)收集在一Eppendorf管中。

↓

ⓓ 用分光光度计测量流出液的A_{260}值。收集峰值高的样品(图6-3)。

↓

ⓔ 加1/10体积3 mol/L NaAc，进行乙醇沉淀以回收DNA(或用乙醚浓缩)。

a. 事先用记号笔标记柱的高度，凝胶悬浮液加入后会或多或少地影响其液面，若液面低于其刻度，应停止排液。用过的柱子不能继续使用，但用2.5 mL 1 mol/L KCl冲洗1次，再用2.5 mL TE冲洗3次，并保存于冰箱中，可继续使用。
b. 注意不要破坏柱子表面。体积大的样品应事先用乙醚浓缩。

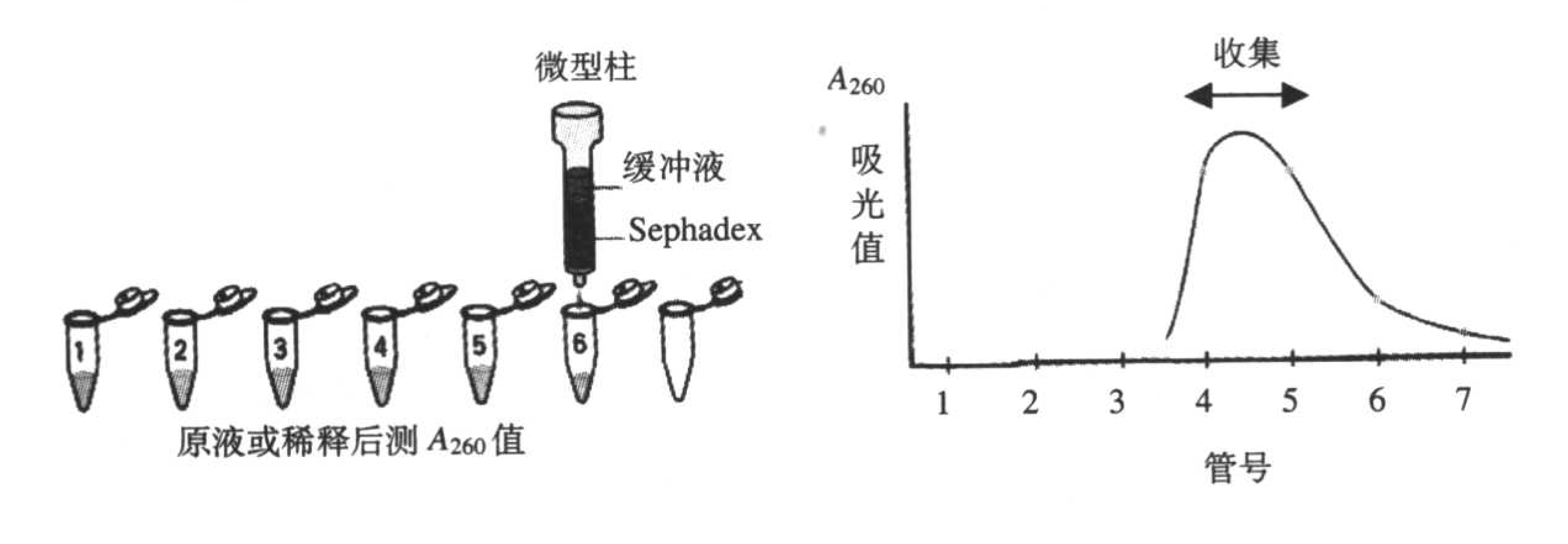


图6-3　使用微型凝胶过滤柱纯化DNA

…Questions……………

1. DNA与RNA在组成上有何区别？各碱基的单字符缩写是什么？
2. DNA在何种条件下相对稳定？如何保存DNA样品？
3. 检测DNA溶液浓度的方法有哪些？各有何优缺点？如何处理溴化乙锭污染物才不致污染环境？

4. 异丙醇沉淀 DNA 与乙醇沉淀 DNA 有什么异同?
5. 如何进行 DNA 纯化? DNA 沉淀的主要方法有哪些? 各有何特点?
6. 为什么在苯酚溶液中常常加入 8-羟基喹啉? 在苯酚/氯仿/异戊醇抽提中，异戊醇又起什么作用?

第七章　扩增与提取质粒 DNA

第一节　质粒有关基本知识

质粒作为稳定地克隆特定 DNA 片段的载体，广泛应用于基因操作的各个方面。

1. 什么是质粒

质粒是存在于细菌或霉菌等细胞中，能自我复制的核外染色体，多为环状 DNA。除了复制起点、决定拷贝数[a]的调控元件外，还存在编码素原因子、性因子(F 因子)、耐药性(R 因子)等与细菌增殖无直接关系的基因(表 7-1)。基因操作中使用的质粒载体[b]较小，拷贝数较高，多由 ColE1[c]衍生而来。

a. 拷贝数：一个细胞中存在的质粒数目。
b. 载体：将外源 DNA 转入宿主细胞的运载体，如质粒、噬菌体等。
c. ColE1：产生大肠杆菌素原因子的小质粒。

表 7-1　质粒特性

质粒	大小/kb	拷贝数	宿主菌特性
ColE1	4.2	10~15	产生素原因子
RSF1030	6	20~40	氨苄青霉素抗性
R6K	25	13~38	氨苄青霉素、链霉素抗性
R	62.5	3~6	对多种药物起钝化作用
F	62	1~2	育性因子。含有 F 因子的为雄性，可转移至雌性菌内

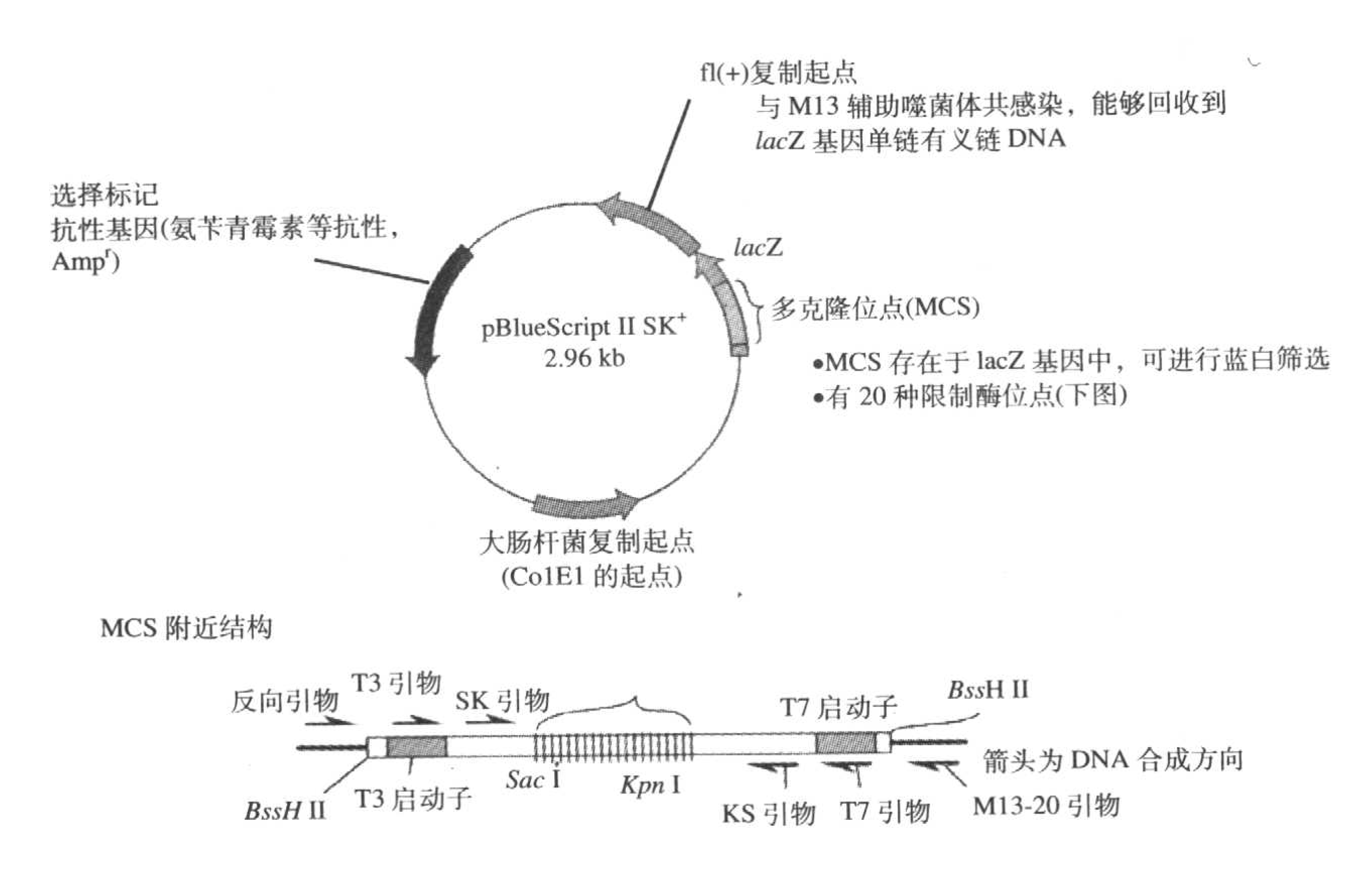


图 7-1　质粒的结构(以 pBlueScript II SK⁺为例)

pBlueScript II SK⁺ 可用于克隆、测序、转录 RNA 及提取单链 DNA 等

2. 质粒载体的选择

作为有用的质粒载体，首先应具有作为选择标志[d]的抗药性基因，应具有多克隆位点(图 7-1)及高拷贝特性。此外，根据研究目的不同，还应具有特殊需要的元件，如测序载体应在多克隆位点两侧具有测序引物序列，表达载体应具有高表达的编码元件。

d. 选择标记：用于区别质粒是否导入或是否重组成功的基因。

第二节 质粒 DNA 提取

载体被选择好后，为便于以后的研究，首先应大量扩增该质粒 DNA (若该质粒已经导入到大肠杆菌中，可直接培养宿主菌，然后从大肠杆菌中提取质粒 DNA)。

1. 质粒提取原理

从细菌中分离质粒 DNA 的方法包括 3 个基本步骤：①培养细菌使质粒扩增；②收集和裂解细胞；③分离和纯化质粒 DNA。采用溶菌酶可以破坏菌体细胞壁，十二烷基硫酸钠(SDS)和 Triton X-100 可使细胞膜裂解。经溶菌酶和 SDS 或 Triton X-100 处理后，细菌染色体 DNA 会缠绕附着于细胞碎片上，同时由于细菌染色体 DNA 比质粒大得多，易受机械力和核酸酶等的作用而被切断成大小不同的线性片段。当用强热或酸、碱处理时，细菌的线性染色体 DNA 变性，而共价闭合环状 DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA)的两条链不会分离。当外界条件恢复至正常时，线状染色体 DNA 片段难以复性，与变性蛋白质或细胞碎片缠绕在一起，而质粒 DNA 双链又恢复至原状，重新形成天然的超螺旋分子，并以可溶状态存在于液相中。在细菌细胞内，共价闭合环状质粒以超螺旋形式存在。在质粒提取过程中，除了超螺旋 DNA 外，还会产生其他形式的质粒 DNA。如果质粒 DNA 两条链中有一条链发生一处或多处断裂，分子就能旋转而链的张力得以消除，形成松弛型的环状分子，称开环 DNA(open circular DNA, ocDNA)；如果质粒 DNA 的两条链在同一处断裂，则形成线状 DNA(linear DNA)。对提取的质粒 DNA 进行电泳时，超螺旋质粒 DNA 的泳动速度比开环和线状分子的泳动速度快。

表 7-2 各种质粒提取方法

方法	纯度	用途	备注
煮沸裂解	低	酶切	省时，费用低
		测序	富含耐热核酸酶的菌株(如 HB101 等)，质粒产量低
碱裂解	较高	酶切	比热变性法纯度高
		测序	可大量提取
			产量与菌株种类无关
试剂盒[a]	高	与碱性 CsCl 法相同	利用与 DNA 有亲和力的二氧化硅进行纯化
			操作简单，省时
			费用高
碱性 CsCl	高	保存	能大量获取高纯度标准品
		转化	能区分不同形式 DNA(环状，闭合环状等)
		转录模板等	费用高，需要超速离心

注：a. 试剂盒提取的 DNA 纯度与 CsCl 法差不多。

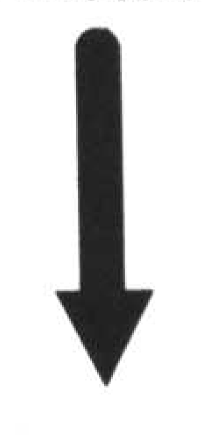
大肠杆菌裂解液中除含质粒 DNA 外，还含有基因组 DNA、RNA、蛋白质及脂类等杂质。基因组 DNA 与质粒 DNA 的化学性质类似，较难分离开来。表 7-2 归纳了各种质粒 DNA 的提取方法。图 7-2 是质粒 DNA 提取基本原理。

利用强碱(或加热)及表面活性剂(SDS)裂解菌体



· 使蛋白质或脂类等菌体成分变性
· 基因组 DNA 产生缺刻，变成线状，并解离成单链(变性)
· 由于质粒 DNA 较小，仍为环状，变性区虽大，但不分离

中和或恢复至室温



· 变性的质粒 DNA 按原互补配对结构复性
· 基因组 DNA 随机复性，与蛋白质等菌体成分结合在一起

离心分离



· 质粒 DNA 存在于上清中，回收

纯化

· 苯酚/氯仿/异戊醇抽取，乙醇沉淀，PEG 沉淀

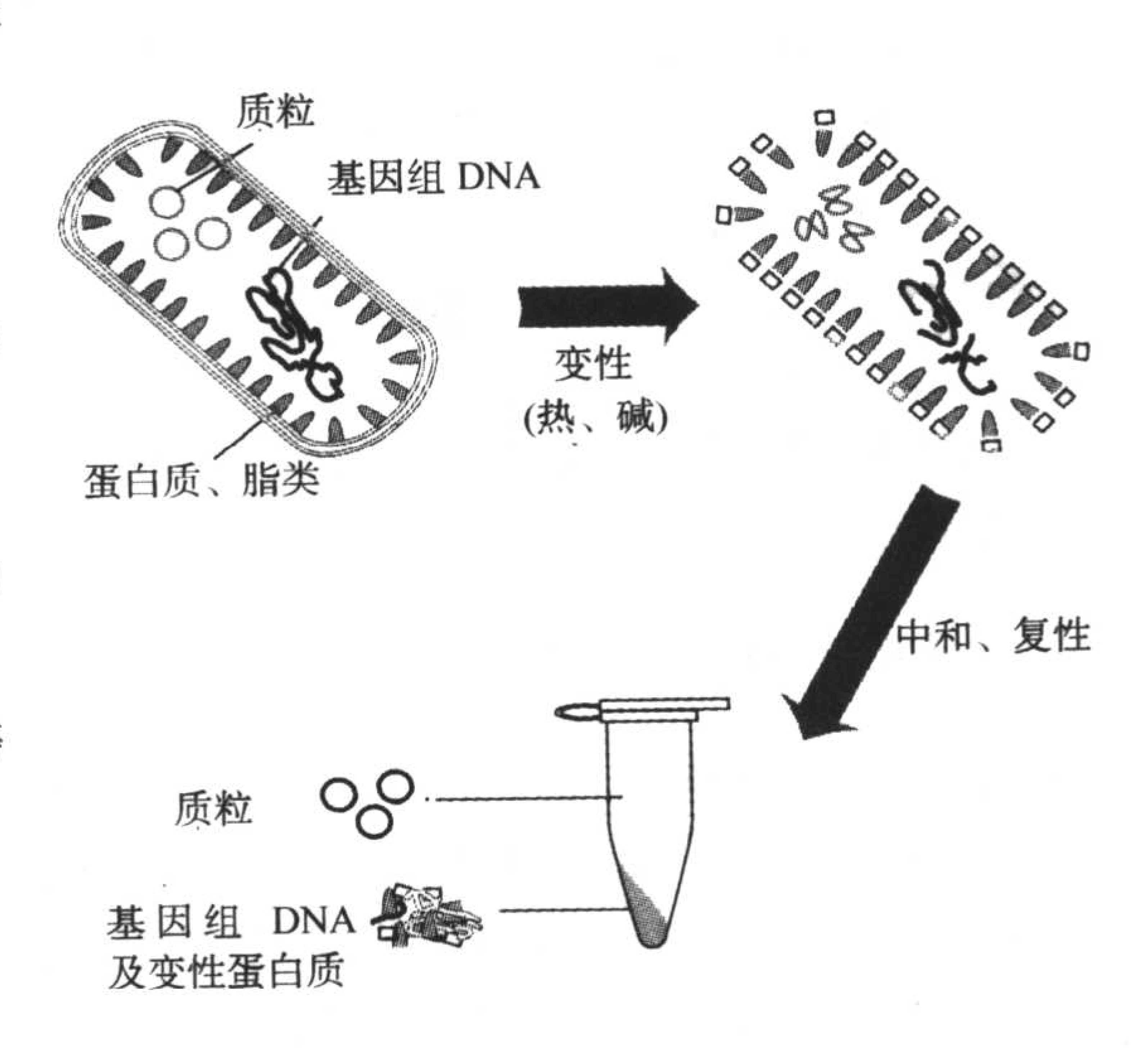


图 7-2　质粒 DNA 提取原理图解

2. 煮沸裂解法

费用低，操作省时，但从富含耐热核酸酶菌株中提取质粒 DNA，产量较低。

Materials

(1) 恒温箱(37℃)
(2) 摇床
(3) 高速离心机
(4) 旋涡混合器
(5) 离心干燥机
(6) STETL 缓冲液(附录一)
(7) 异丙醇
(8) TE
(9) 苯酚/氯仿/异戊醇(25∶24∶1) (附录一)
(10) 7.5 mol/L NH_4Ac
(11) 预冷 100%乙醇、70%乙醇
(12) 5 mg/mL 溶菌酶
(13) 10 mg/mL RNase A (附录一)

Protocols　　　　Time：约 3 h/30 个样品

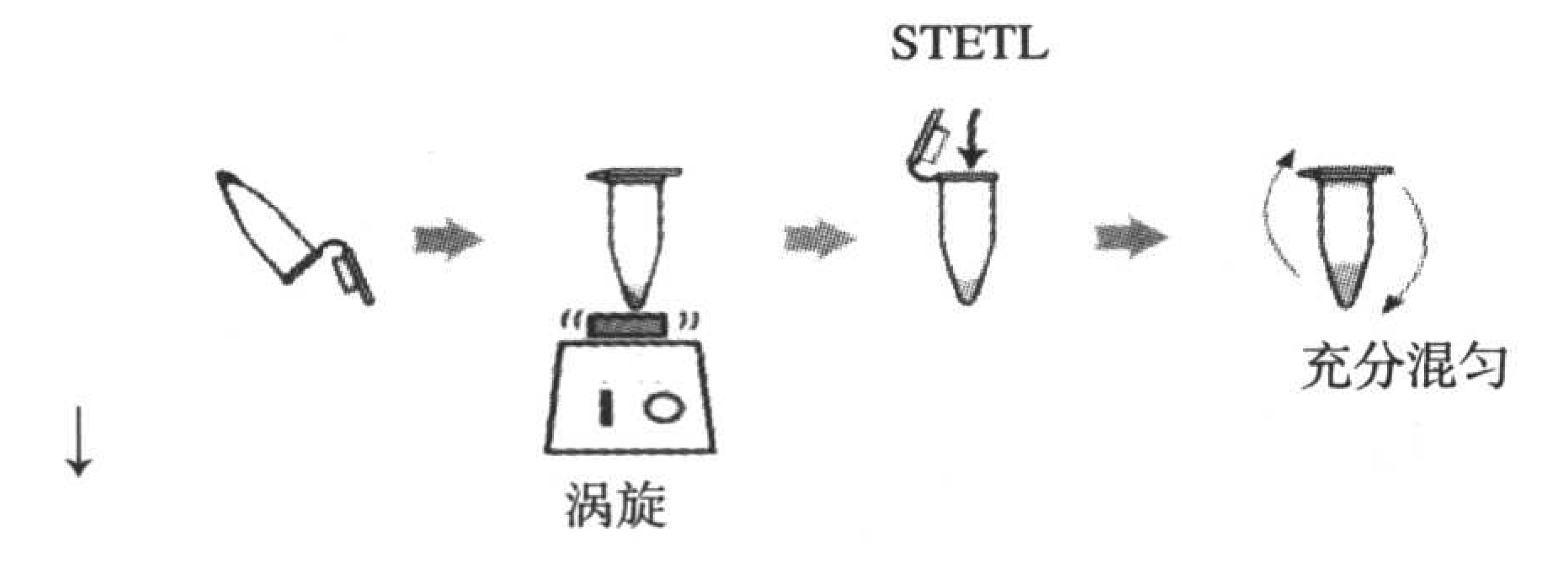
ⓐ 从铺有大肠杆菌的平板中挑选一个单菌落，接种到含有合适抗生素的 2 mL 液体培养基中，37℃振荡过夜[a]。

↓O/N

a. 样品数多，分装所需时间较长。

ⓑ 菌液转移至 Eppendorf 管，15 000 r/min、4℃离心 1 min，弃上清。加 300 μL STETL 缓冲液溶解沉淀[b]。

b. STETL 加入前，应充分悬浮沉淀。



↓

ⓒ 用塑料夹子夹住盖子[c]，在沸水中煮 45 s[d]。

c. 不可用封口膜代替夹子。
d. 时间过长，可能切断质粒 DNA。



↓

ⓓ 4℃、15 000 r/min 离心 10 min，上清转移至新 Eppendorf 管中，加等量异丙醇[e]。

e. 不必加盐。

↓

ⓔ 4℃、15 000 r/min 离心 10 min，加 200 μL TE 溶解沉淀，苯酚/氯仿/异戊醇抽提。

↓

ⓕ 加等体积 7.5 mol/L NH_4Ac 和 2.5 倍体积预冷 100%乙醇，立即进行乙醇沉淀[f]。

f. 为避免低分子杂质沉淀，使用 NH_4Ac。加预冷乙醇后马上离心。

↓

ⓖ 70%乙醇漂洗沉淀。沉淀干燥后，溶于 20~50 μL TE 中。

3. 碱裂解法——小量提取(2 mL)[a]

a. 大于此操作菌量 10 倍(20 mL)的菌液量也可用此方法提取质粒 DNA。

碱裂解法是最常用的提取方法，但产量、纯度、最大样品处理数等，因人而异。

Materials

(1) 恒温箱 37℃
(2) 摇床
(3) 高速离心机
(4) 旋涡混合器
(5) 离心干燥机
(6) 预冷 100%、70%乙醇
(7) 溶液 I (即 TE)

10 mmol/L Tris・HCl (pH8.0)
1 mmol/L EDTA
50 mmol/L 葡萄糖
高温高压灭菌

(8) 溶液 II[b]

0.2 mol/L NaOH
1% SDS (附录一)
新鲜配制

(9) 溶液 III[b]

3 mol/L Kac
1.8 mol/L HAc

(10) 苯酚/氯仿/异戊醇(25∶24∶1) (附录一)
(11) 3 mol/L NaAc (pH5.2) (附录一)
(12) 20%PEG/2.5 mol/L NaCl (附录一)

b. 不必高温高压灭菌，直接使用。

ⓐ 从铺有大肠杆菌的平板中挑选一单菌落，接种到含有合适抗生素的 2 mL 液体培养基中，37℃振荡过夜。

↓ O/N

ⓑ 将菌液转至 Eppendorf 管，4℃、10 000 r/min 离心 5 min，弃上清。沉淀溶于 0.15 mL 预冷溶液 I 中，混匀(吸打和振荡)，冰上放置 15 min。

↓

ⓒ 加 0.25 mL 溶液 II，颠倒 Eppendorf 管 2~3 次，使之充分混匀后(直至溶液变清)，冰上放置 5 min [c]。

c. 透明状，否则应重新配制溶液 II。此步的时间不能过长，否则易掺杂有基因组 DNA。

↓

ⓓ 加 0.2 mL 溶液 III，振荡混匀 [d]，冰上放置 10 min 后，4℃、15 000 r/min 离心 15 min。

d. 若仍透明，表明中和不彻底，应重新配制溶液 III。

↓

ⓔ 上清转至新 Eppendorf 管中 [e]，加 0.6 倍体积异丙醇，室温放置 20 min 以上，进行异丙醇沉淀(不必再添加盐分)。

e. 注意不要吸入杂质。

↓

ⓕ 室温 15 000 r/min 离心 15 min，弃上清。

↓

ⓖ 真空干燥。DNA 沉淀溶于 400 μL 含 10 ng/μL RNase A 的 TE 中，37℃或 60℃温育 30 min 以上(RNase A 处理)。

↓

ⓗ 苯酚/氯仿/异戊醇抽提 2 次。上清加 1 mL 预冷乙醇、40 μL 3 mol/L NaAc，−20℃静置 30 min 以上或−70℃静置 15 min。

↓

ⓘ 15 000 r/min 离心 15 min，弃上清。沉淀用 70%乙醇漂洗、离心、干燥，并溶于 30~50 μL TE 或双蒸水中(若想获得高纯度质粒 DNA，加 0.2 mL 双蒸水或 TE 溶解，再进行以下操作)。

↓

ⓙ 加 0.12 mL 20% PEG/2.5 mol/L NaCl，混匀，冰水中过夜静置(PEG 沉淀)。

↓

ⓚ 苯酚/氯仿/异戊醇抽提 2 次，乙醇沉淀后，漂洗沉淀，干燥。

↓

ⓛ 用 30~50 μL TE 或双蒸水溶解沉淀 [f]。

f. 质粒 pBlueScript SK$^+$ 浓度大约为 1 μg/μL。

4. 碱裂解法——大量提取(800 mL)

在质粒保存、转化或体外转录实验中常需要大量的高纯度质粒 DNA，因此需要进行质粒的大量提取。使用方法仍是碱变性法，但增加 CsCl 密度梯度离心步骤以进一步纯化 DNA。下面介绍的是 800 mL 菌液量的流程(图 7-3)。若是高拷贝质粒(如 pBlueScript 或

pUC 等)，100~400 mL 菌量即可满足上述研究需要。

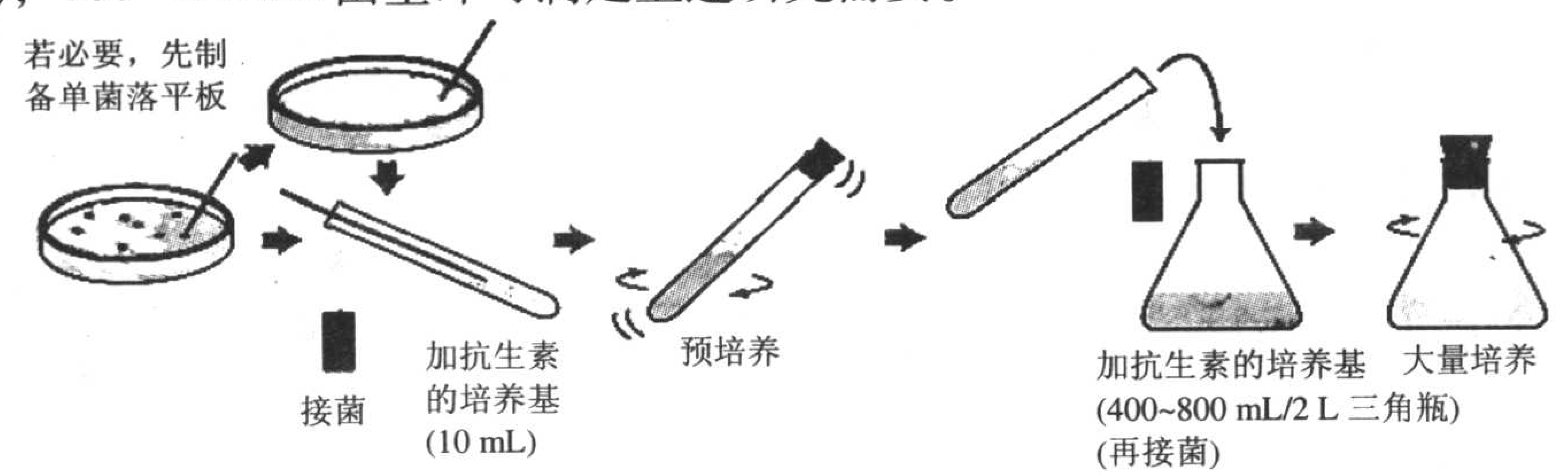


图 7-3　大肠杆菌质粒大量提取流程图

Materials

(1) 恒温箱(37℃)
(2) 摇床
(3) 小型高速离心机
(4) 高速离心机、离心管 (15 mL、40 mL、250 mL、500 mL)
(5) 超速离心机、超速离心管
(6) 离心干燥机
(7) 2 L 三角瓶
(8) 旋涡混合器
(9) 透析袋
(10) 1 mL 注射器及针头
(11) 溶液 I、溶液 II、溶液 III
(12) 10 mg/mL EB 溶液(附录一)
(13) CsCl/TE 溶液

TE	50 mL
CsCl	50 g

(14) 3 mol/L NaAc (pH5.2) (附录一)
(15) 10 mg/mL RNase A (附录一)
(16) TE
(17) 苯酚/氯仿/异戊醇(25：24：1)(附录一)
(18) 预冷 100%乙醇和 70%乙醇
(19) TE 饱和丁醇
n-丁醇和 TE 等量混合均匀，待其分层后，上层即为 TE 饱和的 n-丁醇层，下层为 TE。取上层使用。
(20) 100 mg/mL 蛋白酶 K 溶液(附录一)

Protocols　　　　Time：36 h

ⓐ 从铺有大肠杆菌的平板中挑选单菌落，接种到含有合适抗生素的 10 mL 培养基中，37℃振荡培养过夜(作为初始培养菌)。

↓ O/N

ⓑ 准备含相应抗生素的培养基 800 mL 于 2 L 三角瓶中，加入初始培养菌后于 37℃过夜振荡(150~200 r/min)培养。

↓ O/N

ⓒ 将菌液分装于 500 mL 离心管中，4℃、2000 *g* 离心 10 min，弃一半的上清，混匀。将 2 管菌液合并成一管，再离心，彻底弃上清。

↓

ⓓ 加含 20 mg 溶菌酶的 20 mL 溶液 I 重悬沉淀，室温放置 20 min 以上。

↓

ⓔ 加 40 mL 溶液 II，颠倒数次混匀后，冰上放置 10 min[a]。

a. 严格遵守操作规定的时间。

↓

ⓕ 加 30 mL 预冷溶液 III，颠倒数次使之混匀，冰上放置 10 min[a]。4℃、6000 *g* 离心 15 min。

↓

ⓖ 上清转至新的 250 mL 离心管中[b]。

↓

ⓗ 加 56 mL 异丙醇，颠倒混匀，室温放置 20 min 以上。

↓

ⓘ 4℃、6000 *g* 离心 15 min。沉淀溶于 10 mL TE 中[c]，再转移至 50 mL 离心管中。

↓

ⓙ 苯酚/氯仿/异戊醇抽提 2 次。

↓

ⓚ 加 1 mL 3 mol/L NaAc 和 2.5 倍体积预冷 100%乙醇，4℃、6000 *g* 离心 10 min。

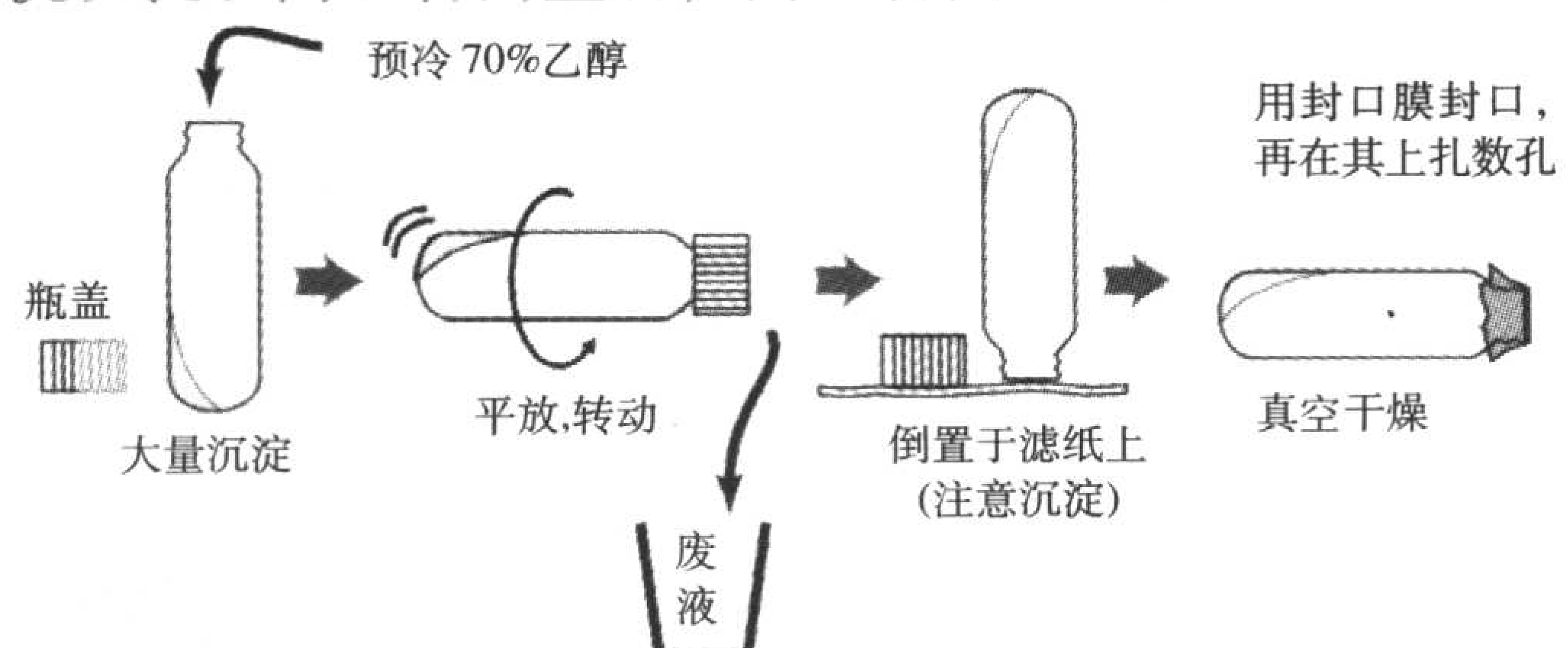
↓

ⓛ 加 70%乙醇漂洗沉淀和离心管内壁后，离心管倒置于吸水纸上，真空干燥。

b. 如下图所示，用纸巾过滤可防止沉淀混入。



c. 不是一次加 10 mL TE，而是分次加入 TE，这样损失小。



↓

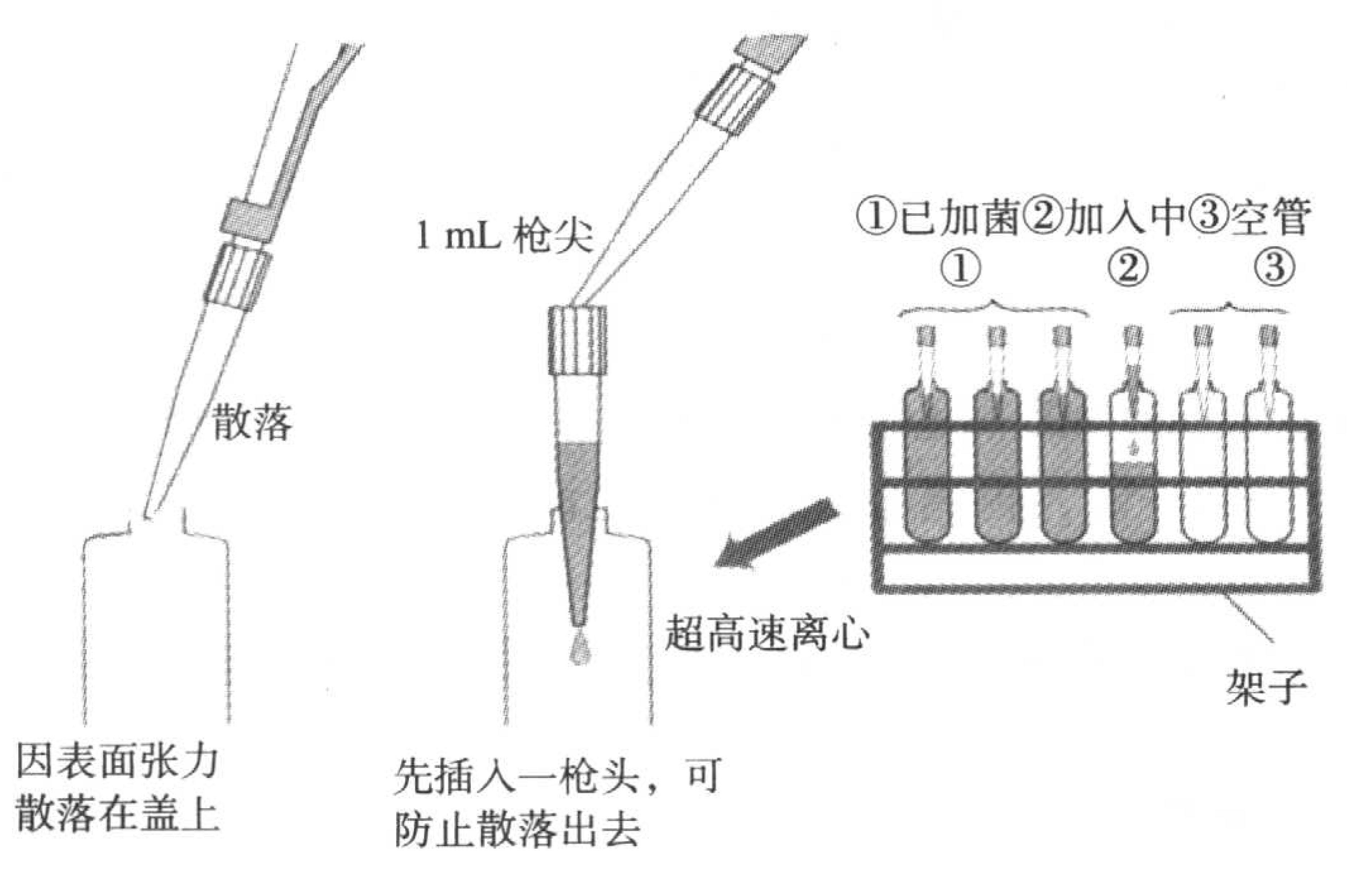
ⓜ 沉淀溶于 3.6 mL TE 中，转入 15 mL 离心管，加 4.4 g CsCl 和 0.4 mL EB 溶液，用旋涡混合器充分溶解[d]。

↓

ⓝ 室温、3000 r/min (1500 *g*)离心 10 min，上清转入超速离心管中[e]。

d. CsCl 易盐析，不可低温操作。

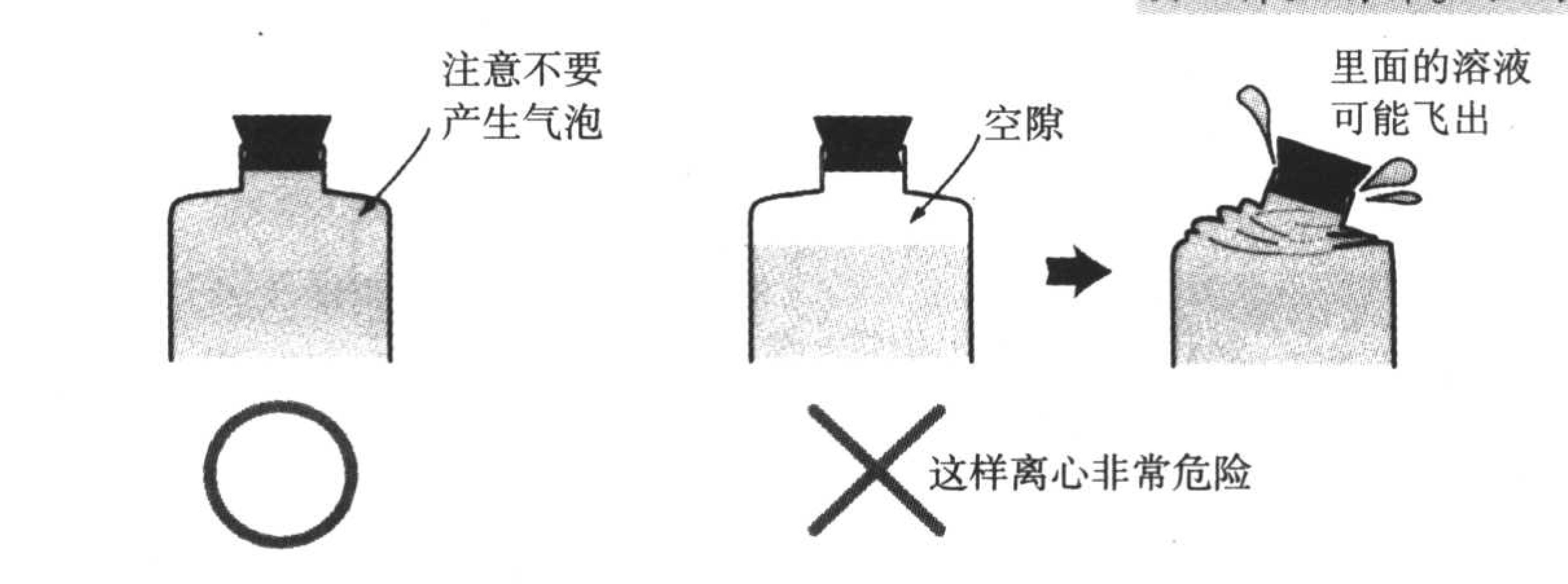
e. 不要吸入蛋白质与 EB 凝结体。超速离心管口非常细，因表面张力易散落出去，应按图所示进行操作。



↓

ⓞ 加 CsCl/TE 溶液于平衡管中，称重平衡[f]。25℃、80 000 r/min (400 000 g)离心 3.5 h。

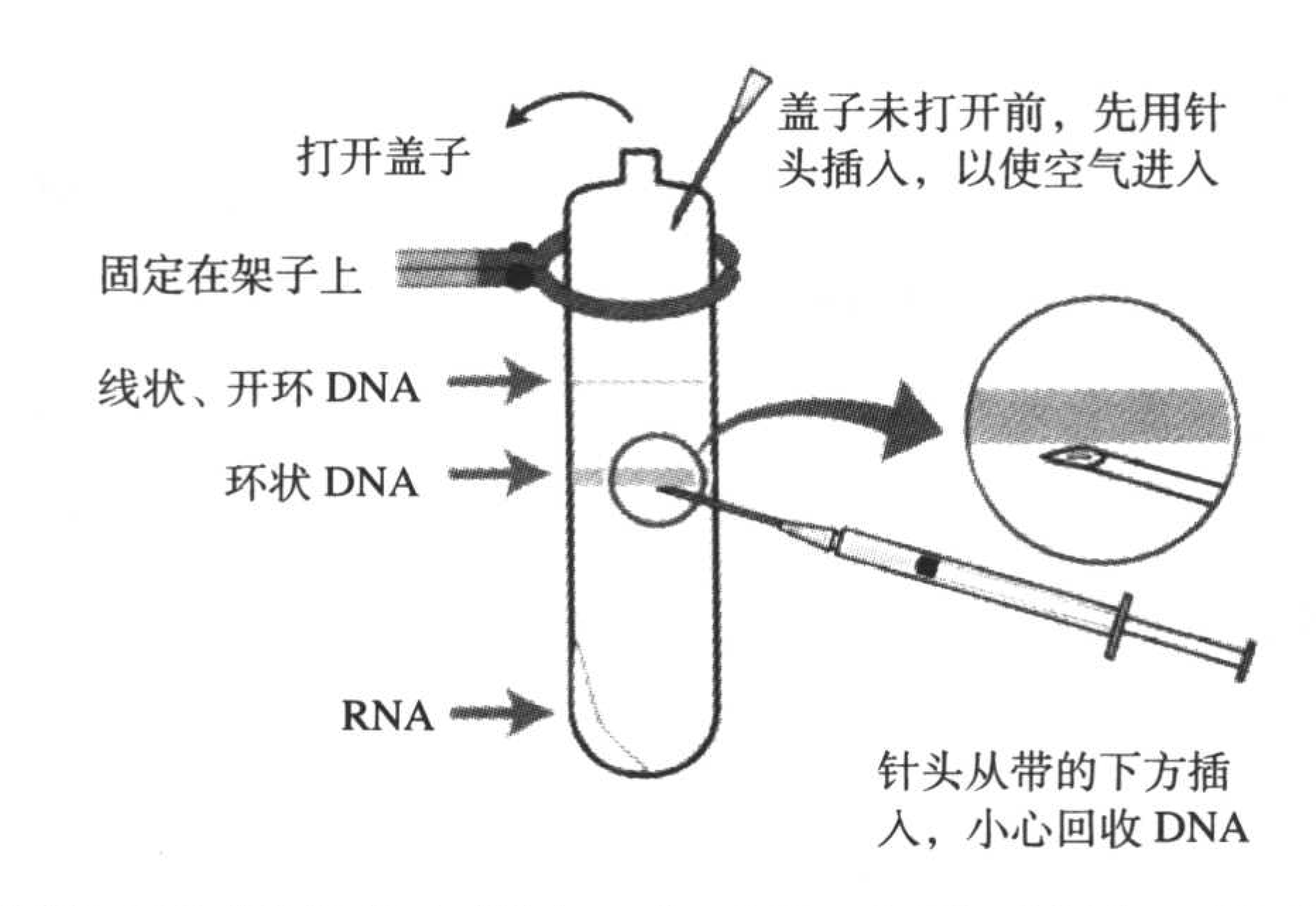
f. 用精密天平称重平衡，而且必须加样至肩部。否则非常危险。



↓

ⓟ 打开盖子，将注射器从瓶壁上插入到橙色环状 DNA 带区域[g]，回收 DNA。

g. 在普通光照下，DNA 带呈橙色，若颜色不明显，可在紫外灯下确定其位置。针头过细，将剪碎 DNA。



↓

ⓠ 回收的 DNA 样品转至新超速离心管中，加 100 μL EB 溶液。用 CsCl/TE 称重平衡。

↓

ⓡ 再次用 80 000 r/min (400 000 g)，25℃离心 3.5 h。打开盖子，回收环状 DNA 带。

↓

ⓢ 加等量 TE 饱和的 n-丁醇[h]，充分混匀。

h. 可用异丙醇代替。

↓

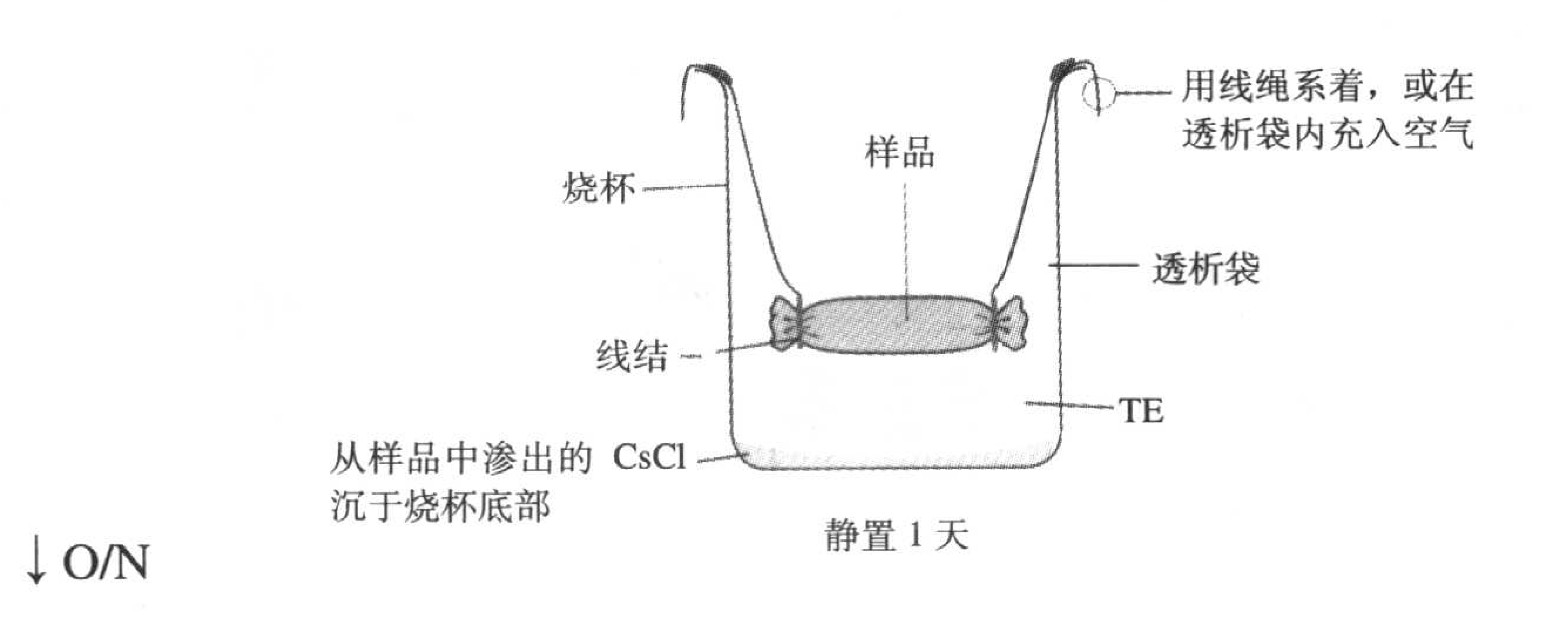
ⓣ EB 移至上层，呈紫红色，弃入次氯酸钠废液缸中。

↓

ⓤ 反复操作ⓢⓣ步骤。直至紫红色消失。

↓

ⓥ 室温下于 1 L TE 中透析，以去除样品中的 CsCl。



↓ O/N

ⓦ 加 5 μL RNase A 溶液，37℃保温 30 min[i]。

↓

ⓧ 加入 2 μL 蛋白酶 K 溶液，37℃保温 30 min[j]。

↓

ⓨ 苯酚/氯仿/异戊醇抽提 2 次。

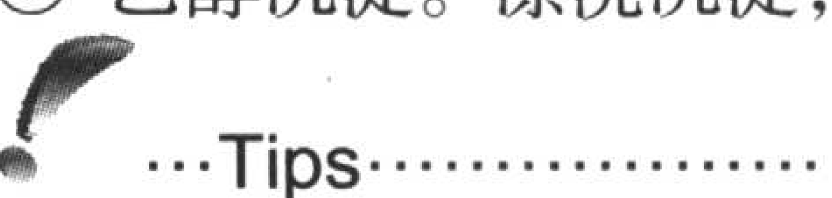
↓

ⓩ 乙醇沉淀。漂洗沉淀，干燥。沉淀溶于适量 TE 或双蒸水中[k]。

i. 不用 RNase A 处理也可。

j. 降解掉残留的微量蛋白质及加入的 RNase A。

k. 大约 100 μL。浓度约为 1~3 μg/μL。



1. 质粒扩增

可用下面方法扩增 pBR322 等拷贝数较少的质粒：在宿主菌生长至指数生长前期(A_{600} 为 0.3~0.4)，加 0.15~0.20 mg/mL 氯霉素，再继续培养。这是因为氯霉素能抑制调控质粒拷贝数基因的表达。

2. 质粒种类

根据质粒性质的不同，有如下几种分类方法。

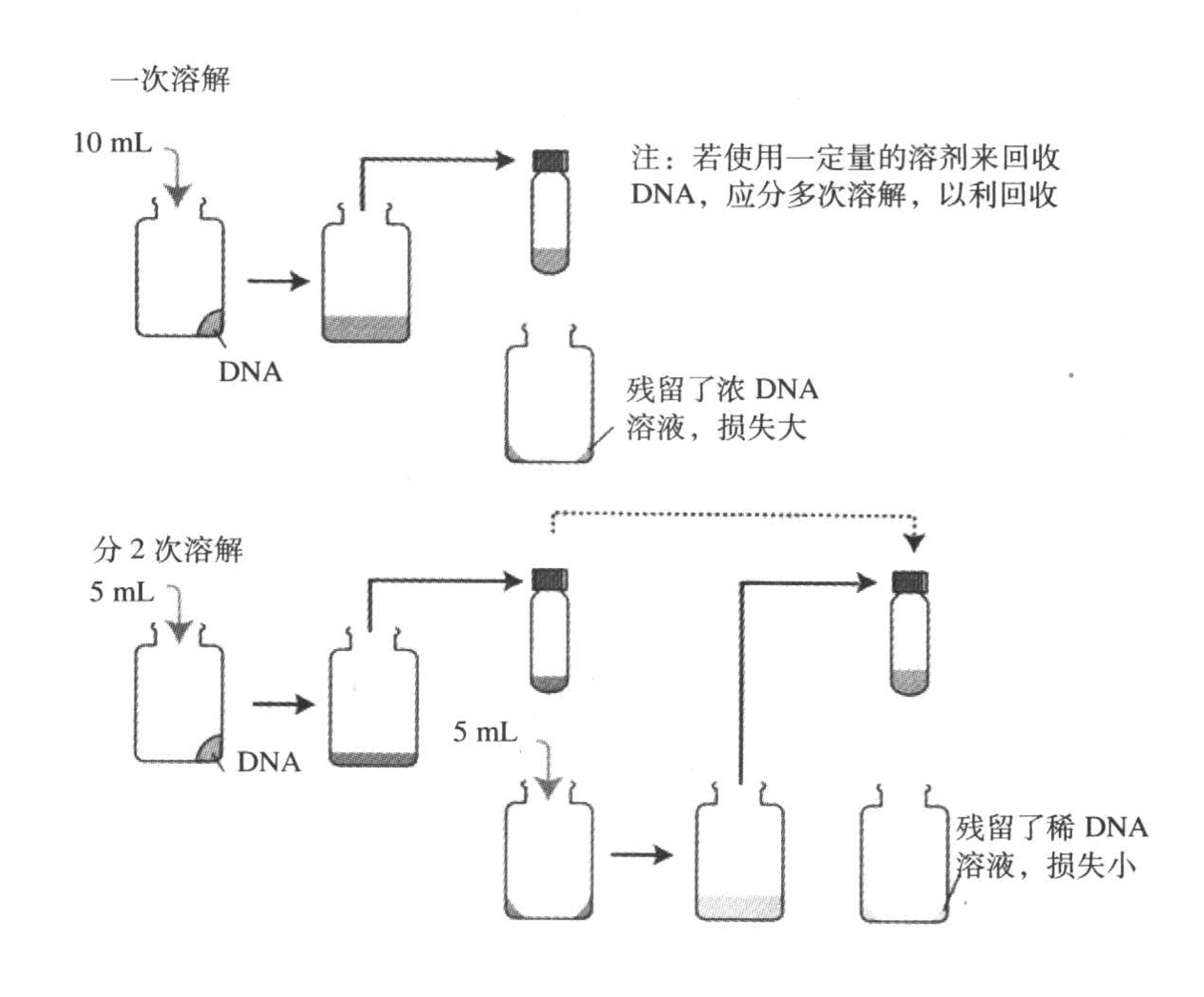
(1) 拷贝数。质粒 DNA 的复制是由细菌染色体的多种酶系和质粒 DNA 区域内的部分基因共同完成的，不同质粒具有不同酶系，因此出现不同质粒在同一宿主中的拷贝数差异悬殊的现象，多的在数十、数百，叫做“高拷贝质粒”(又名松弛型质粒)；少的仅 1 个或数个，叫做“低拷贝质粒”(又名严紧型质粒)。在蛋白质合成抑制剂——氯霉素存在时，染色体 DNA 复制受阻，此时，低拷贝质粒的复制也通常停止，但高拷贝质粒仍可继续复制 12~16 h，使原来的拷贝数大幅度提高到数百、数千拷贝，质粒 DNA 含量由原来的 2%增加到 40%~50%。

(2) 相容性。质粒上除了有控制复制的基因外，还有决定不同质粒是否可以在同一宿主上共存的基因，能稳定共处的质粒称之为“相容性质粒”，不能共处的称之为“不相容性质粒”。

(3) 选择标记。用于分子生物学研究的质粒通常具有抗药性，如氨苄青霉素抗性。此外，也常用针对特异底物的特异反应特性来筛选重组体的标记，如蓝白筛选。

(4) 应用性。质粒的应用主要有基因克隆和基因表达两方面，所以又分克隆质粒载体和表达质粒载体。克隆载体通常具有极良好的多克隆位点、极高的转化效率和分离纯化特性，常用于基因文库构建和基因分子操作。表达载体由于含有用于表达的特异元件，在转化率、操作性等方面不如克隆载体。

3. 回收 DNA 方法



第三节　质粒 DNA 纯化

1. 用聚乙二醇(PEG)纯化质粒

提取的质粒 DNA 纯度可通过紫外分光光度计测定其 A_{260}/A_{280} 来检测。用琼脂糖凝胶电泳可检测提取物中的质粒 DNA 浓度或是否杂有基因组 DNA、RNA 等。基因组 DNA 难以去除(多数用超速离心法去除)，但 RNA 可用 RNase A 消化，然后再通过 PEG 沉淀法去除切碎的 RNA 碎片。

PEG 是以 $-(—CH_2—CH_2—O—)_n-$ 结构组成的高分子化合物，与 DNA 溶液中的水紧密结合，从而使 DNA 沉淀。RNA 的 2′ 位是—OH 基，亲水性能好，PEG 难与其溶液中的水结合，而使 RNA 溶于水中，不产生沉淀。常用的 PEG 是平均相对分子质量为 7500 的 PEG6000。

Materials

(1) 小型高速离心机
(2) 旋涡混合器
(3) 离心干燥机
(4) 20% PEG/2.5 mol/L NaCl (附录一)
(5) 苯酚/氯仿/异戊醇(25∶24∶1)(附录一)
(6) 预冷 100%乙醇、70%乙醇
(7) TE

Protocols　　Time：约 1.5 h

ⓐ RNase A 消化后的质粒 DNA 溶液[a]。

↓

ⓑ 加入 0.6 倍体积的 20% PEG/2.5 mol/L NaCl 溶液，充分混匀。

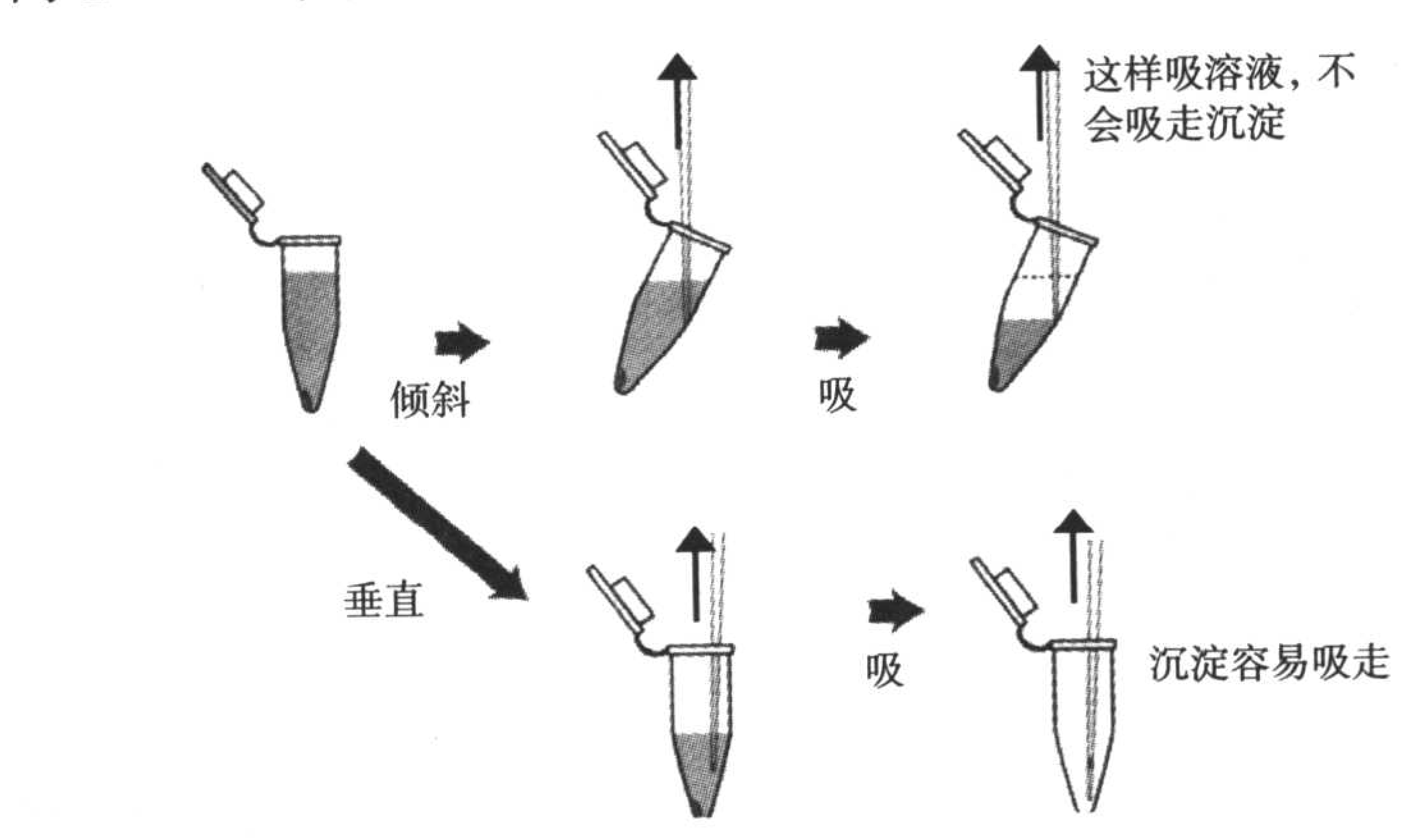
↓

a. 溶液中混有苯酚，易产生析出现象。用乙醇沉淀方法可去除苯酚。

ⓒ 冰上放置 1 h。

↓

ⓓ 4℃、15 000 r/min 离心 20 min，用下面的方法吸走上清。



↓

ⓔ 再次离心，小心去除残留的上清。

↓

ⓕ 溶解于 200 μL TE 或双蒸水中，进行苯酚/氯仿/异戊醇抽提[b]。

b. 该操作目的是为了去除 PEG，因为 PEG 会抑制酶促反应(如连接)。

↓

ⓖ 乙醇沉淀后漂洗，然后用离心干燥机干燥沉淀，加 30~50 μL TE 或双蒸水溶解沉淀。

2. 使用试剂盒纯化质粒

使用质粒提取试剂盒可在短时间内获取高纯度的质粒 DNA，且不需要超速离心机，产量也很稳定，因此尽管费用较高，但仍受人欢迎。

Materials

(1) QIAGEN 高速质粒中量提取试剂盒(HiSpeed Midi Tip、QIAfilter Midi Cartridge、QIA 过滤器及 5 mL、20 mL 注射器)

(2) 50 mL 离心管

(3) Eppendorf 管

(4) QIAGEN 高速质粒中量提取试剂盒(P1[a] 缓冲液、P2 缓冲液、P3 缓冲液、QBT、QC、QF、TE、RNase A)

(5) 异丙醇

(6) 预冷 70%的乙醇

a. RNase A 在用前加入到 P1 缓冲液中。P3 缓冲液应预冷至 4℃。

Protocols　　Time：45 min

ⓐ 培养 50~150 mL 菌液[b]。6000 r/min，离心 10 min，收集菌体。

↓

ⓑ 用 6 mL P1 缓冲液悬浮大肠杆菌。

↓

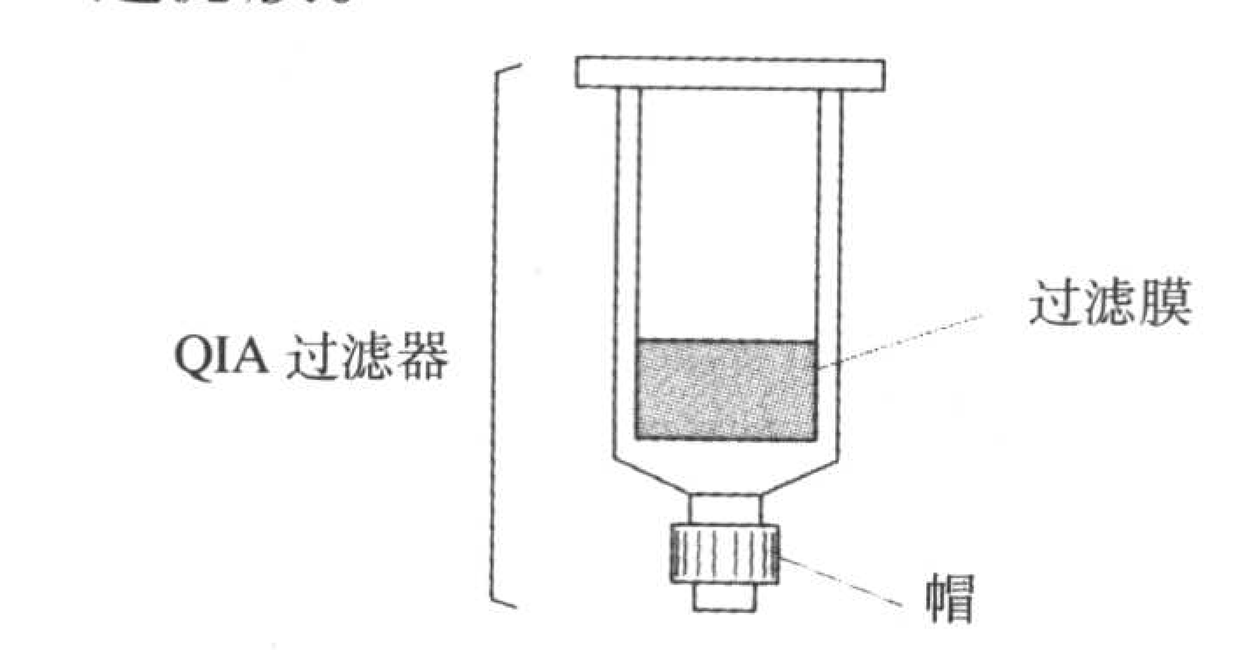
ⓒ 加 6 mL P2 缓冲液，轻轻混匀[c]，室温下放置 5 min。

↓

b. 高拷贝质粒，50 mL 菌液，可得 100~200 μg 质粒。低拷贝质粒，150 mL 菌液，可得 30~100 μg 质粒。

c.不能使用旋涡混合器(打断基因组 DNA)。严格遵照规定的操作时间。

ⓓ 如下图所示，安装 QIA 过滤膜。



↓

ⓔ 加 6 mL 预冷 P3 缓冲液，立即混匀[d]。

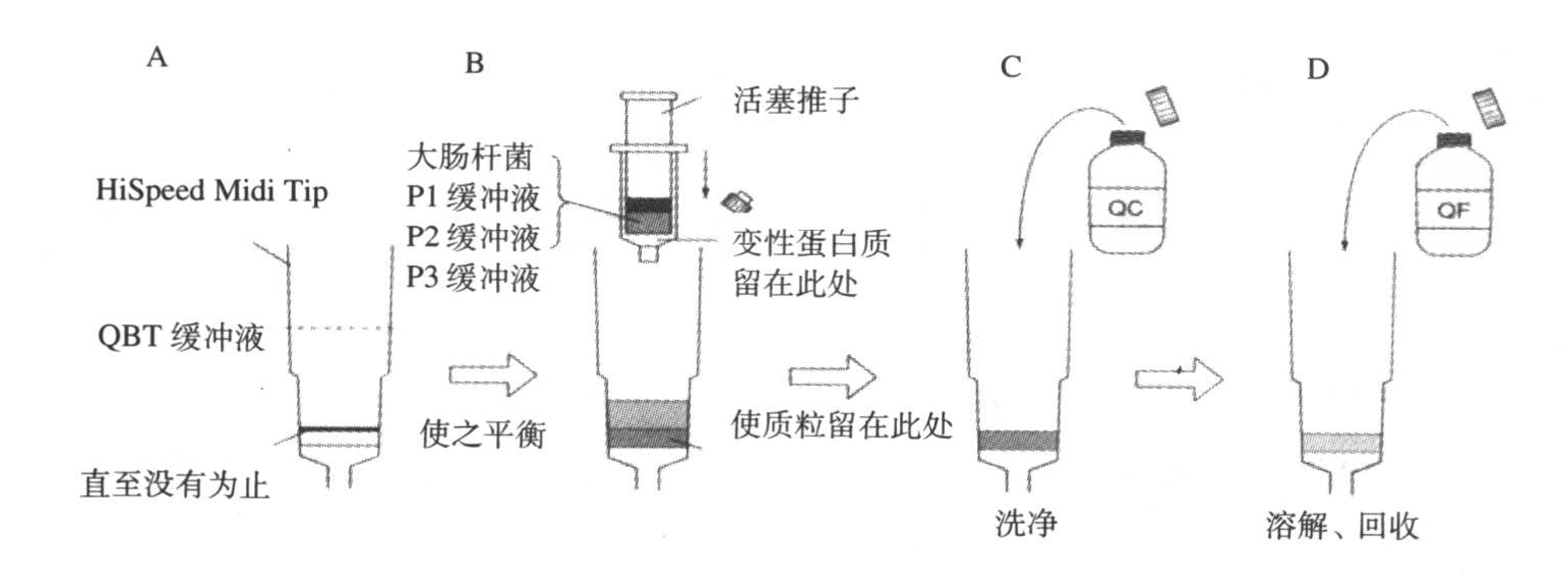
d. 检查是否产生白色混浊物(蛋白质变性物)。

↓

ⓕ 注入ⓓ组装的 QIA 过滤膜，室温下静置 10 min。

↓

ⓖ 加 4 mL HiSpeed Midi Tip QBT 缓冲液，直至 Tip 内液量消失，按图 A 所示进行平衡。



↓

ⓗ 摘掉帽子，插入活塞推子，注入ⓖ步平衡的 Tip 中[e](图 B)。

e. 用 QIA 过滤膜过滤，滤液中的质粒被堵在 HiSpeed Midi Tip 内。

↓

ⓘ 用 20 mL QC 缓冲液洗净 Tip (图 C)。

↓

ⓙ 用 5 mL QF 缓冲液溶解 Tip 内的质粒，回收(图 D)。

↓

ⓚ 在回收液中加 3.5 mL 异丙醇，室温放置 5 min。

↓

ⓛ 如图 E 所示，安装 QIA 过滤器[f]。

↓

ⓜ 在ⓛ中加ⓚ，推动活塞，使之通过 QIA 过滤器[g]。

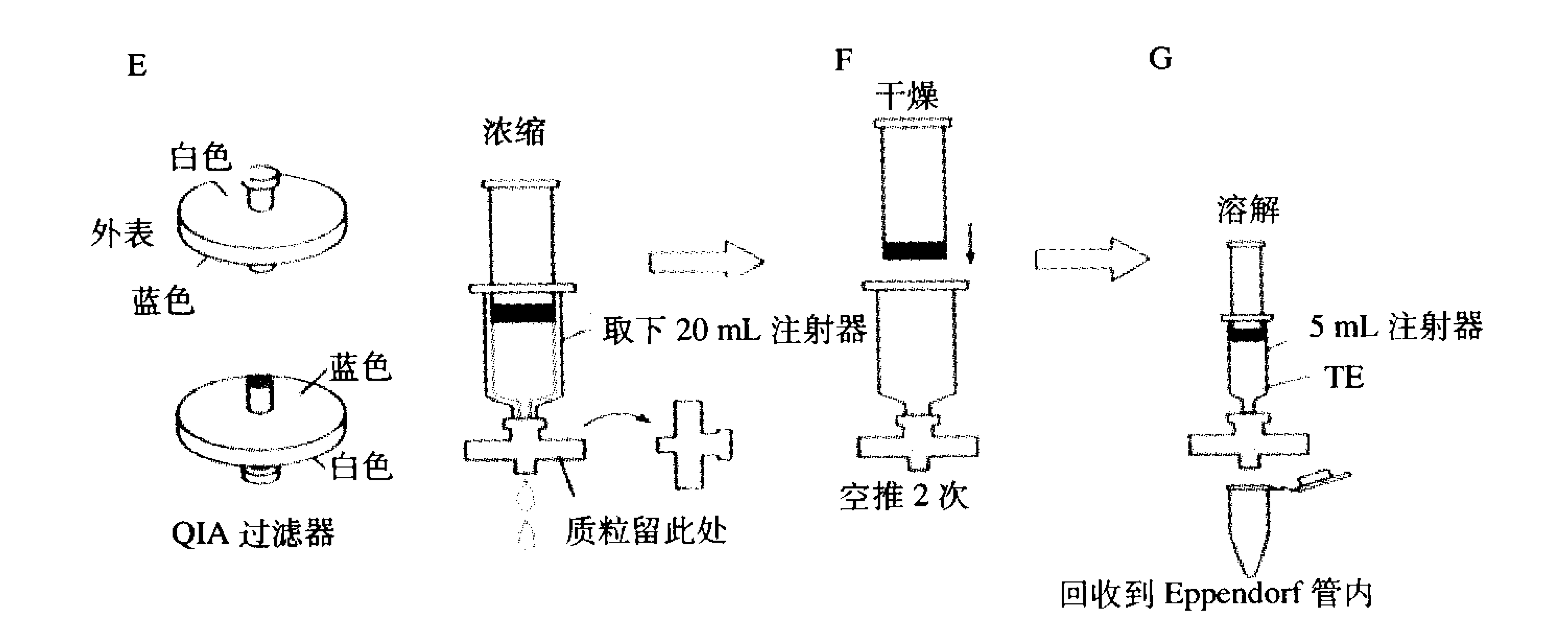
f. 推动活塞之前应摘下 QIA 过滤器(空压破坏 QIA 过滤器的内部结构)。

g. 质粒留存于 QIA 过滤器。

↓

ⓝ 摘掉 QIA 过滤器后，拔出活塞[f]，再安装 QIA 过滤器，空推，使之干燥，再重复操作 1 次(图 F)。

↓



ⓞ 摘下 QIA 过滤器，检查出口喷嘴是否有液体。取下 5 mL 注射器的活塞，再如 E 图所示安装 QIA 过滤器。

↓

ⓟ 加 1 mL TE，如图 G 所示，插入活塞使之溶解，回收到 Eppendorf 管内。

↓

ⓠ 用ⓟ得到的溶液再注入 QIA 过滤器，再回收，测吸光度。若浓度较稀，用乙醇沉淀浓缩。



…Questions………………

1. 为什么基因操作技术中常需要提取质粒 DNA？质粒的哪些性质与提取有关？
2. 人工改造质粒载体改掉了天然质粒的哪些不足？
3. 碱法提取质粒 DNA 时应注意哪些问题？溶液 I、II、III 的作用分别是什么？PEG 沉淀的原理和目的是什么？
4. 本不该长出菌落的对照平板上长出了一些菌落，解释发生这一现象的原因。
5. 描述质粒 DNA 电泳图谱，并解释可能产生的现象及原因。
6. 既然碱法提取质粒 DNA 的流程非常成熟，为什么厂家还大力开发质粒提取试剂盒，而且市场销售还很好？

第八章　DNA 转化

将质粒导入大肠杆菌或其他细胞内的过程叫转化。与噬菌体不同，质粒本身不具备感染细胞的能力。为了使细胞能吸收外来 DNA，必须改变其细胞生理状态，使之具有很高的接收外源 DNA 的能力，这种具有接收外源 DNA 能力的细胞叫感受态细胞。

第一节　制备感受态细胞

有许多种方法制备高效感受态细胞。$CaCl_2$ 法可以获得较好的转化效率，易操作且无需特殊设备，因此是分子生物学研究中最受欢迎的方法。但若想得到更高的转化效率，应使用电击方法，电击法比 $CaCl_2$ 法通常提高数十倍、甚至数百倍，但需要昂贵的电转化仪及辅助设备。两种方案的感受态细胞的制备方法不同，这点一定注意，错误地使用感受态细胞将使转化失败。感受态细胞制备完毕后可以在低温保存一定时间，保存的温度越低，保存的时间则越长。随着保存时间的延长。转化效率将逐渐降低，在−70℃下保存半年内，转化效率影响不大。

1．$CaCl_2$ 法

其原理是 $CaCl_2$ 能改变细胞膜的通透性。该方法制作费用较低、操作简单，但所制作的感受态细胞转化率低，如 JM109 大约为 8×10^5 cfu/μg[a]，HB101 大约为 10^6 cfu/μg，只能满足一般试验需求。该方法的技术要点是使菌体始终保持低温状态，因此操作上既要谨慎，又要迅速。

a. cfu：colony forming unit,形成的菌落数。通常指 1 μg 质粒 DNA(如 pBR322)转化产生的菌落数。

Materials

(1) 高速离心机

(2) 40 mL 灭菌离心管

(3) 预冷 20 mmol/L $CaCl_2$ 溶液(附录一)

(4) LB 培养基(附录一)

(5) 预冷 50 mmol/L $CaCl_2$/15%甘油溶液

1 mol/L $CaCl_2$	25 mL (附录一)
甘油	75 mL

用双蒸水定容至 500 mL，高温高压灭菌

Protocols　　Time：14 h

(为防止污染，在超净台上操作！)

ⓐ 从铺有大肠杆菌平板中挑选一个单菌落，接种到 2 mL LB 培养基中，37℃振荡过夜(预培养)。

↓ O/N

ⓑ 转接到 4 支 20 mL LB 培养液里(每支加 0.2 mL 预培养液)，37℃振荡培养至 A_{600}=0.4~0.7(2~4 h)[b]。

b. 不同种类的菌，其 A_{600} 不同，JM109 为 0.6~0.7，HB101 为 0.4。

↓

ⓒ 预冷如下用品[c]：

· 40 mL 离心管 2 支→冰上静置

· 1.5 mL Eppendorf 管 80 支→–70℃放置(事先做上标记，包括日期、菌株名等)

↓

ⓓ 培养液转至预冷 40 mL 离心管中，冰上静置 10 min[d]。

↓

ⓔ 0℃、500 *g* 离心 5 min (从该步开始，所有离心操作不可使用制动减速，而是让离心机自动减速)[e]。

↓

ⓕ 弃上清，加 8 mL(1/5 量) 50 mmol/L $CaCl_2$ 溶液，冰上轻轻搅动以充分悬浮沉淀[f]。

↓

ⓖ 0℃、500 *g* 离心 3 min，弃上清。

↓

ⓗ 再次用 8 mL(1/5 量) 50 mmol/L $CaCl_2$ 溶液悬浮沉淀，在冰水中静置 30 min[g]。

↓

ⓘ 0℃、500 *g* 离心 3 min，弃上清。

↓

ⓙ 加 4 mL (1/10 量)预冷 $CaCl_2$/15%甘油溶液，冰上轻轻搅动沉淀，充分悬浮后，冰上放置 2 h[h]。

↓

ⓚ 轻轻搅动离心管，使菌液浓度均一，按每管 100 μL 分装到预冷 Eppendorf 管中后，用干冰/乙醇或液氮速冻后，保存于–70℃冰箱中[i]。

c. 所有容器均应高温高压灭菌，并预冷。

d. 应检查是否已冷却(但不可结冰)。

e. 转头应预冷。

f. 沉淀悬浮后马上离心，搅动过程中要注意保持低温状态。

g. 完全悬浮状态下放置。

h. 完全悬浮状态下放置，时间可更长些，注意离心管与冰之间不要留有缝隙。

i. 该操作最好在低温下由两人合作完成(图 8-1)。Eppendorf 管应预冷，分装过程中应晃动菌体以使其均一。可用液氮或干冰/乙醇或干冰/丙酮速冻。

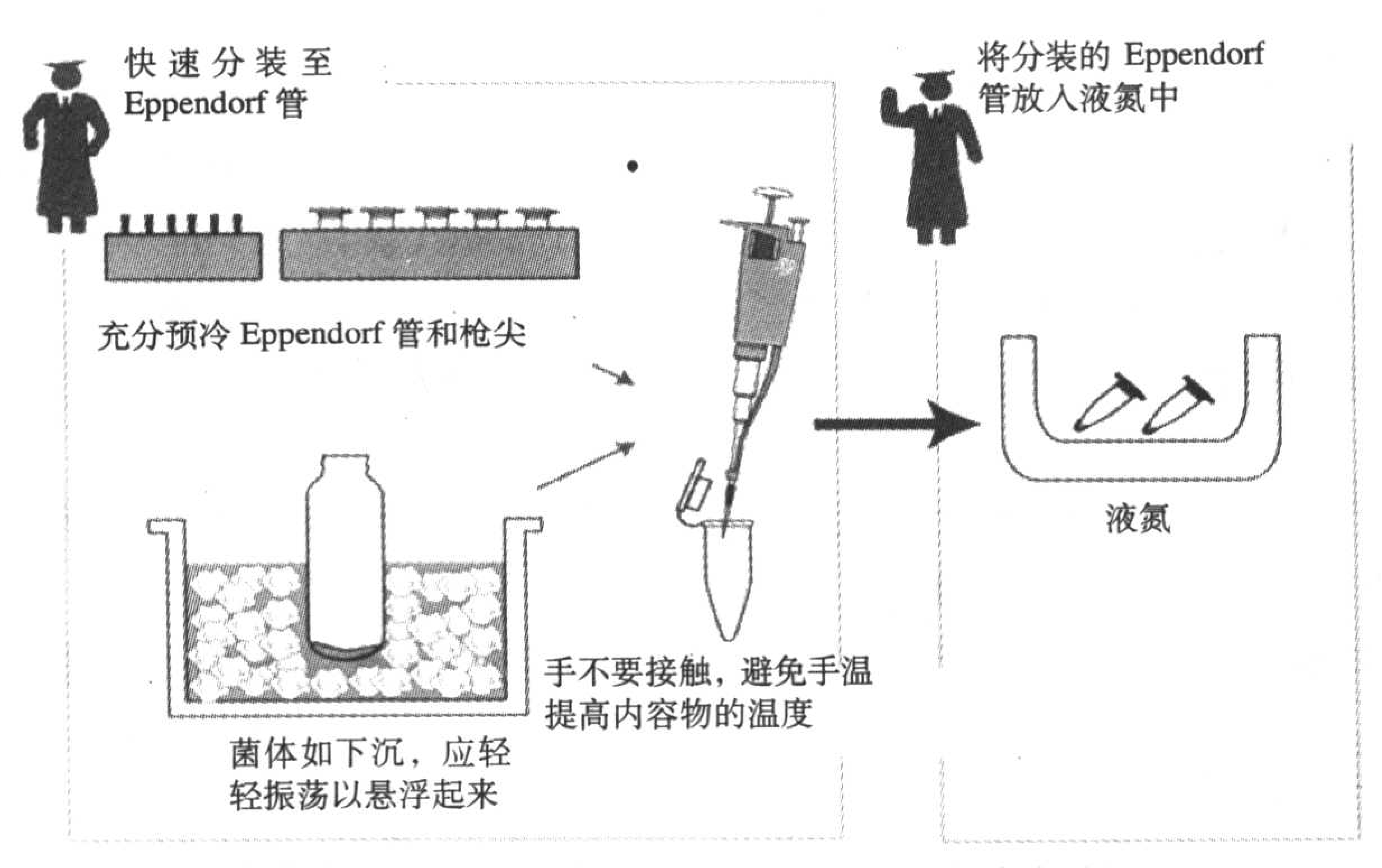
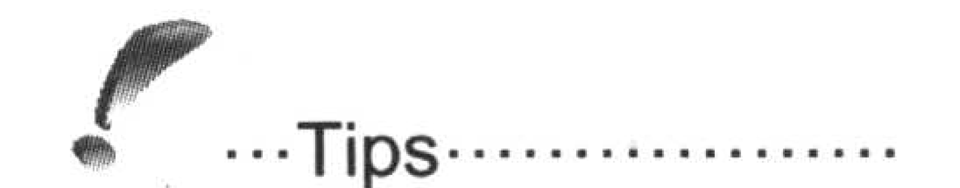
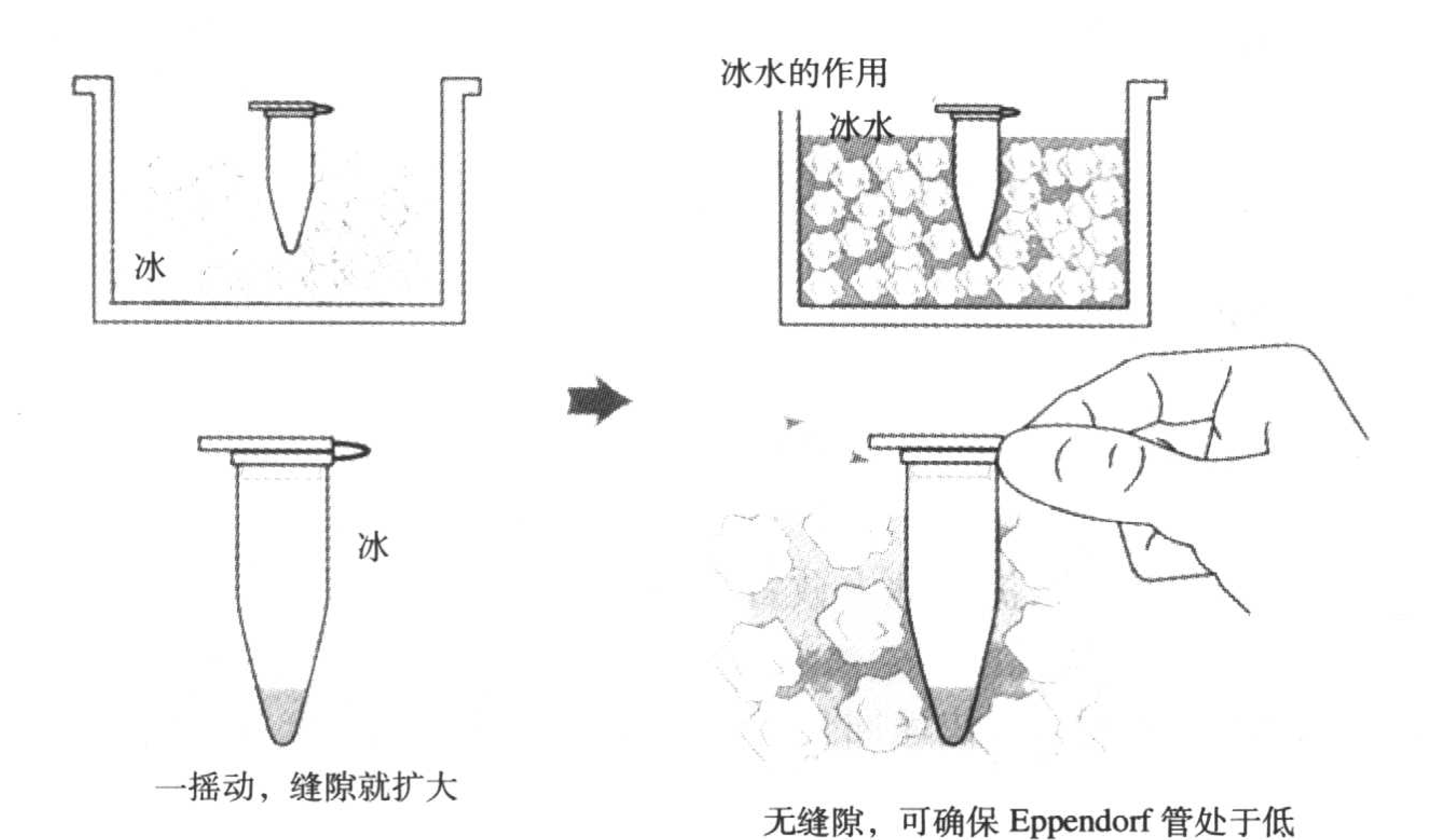


图 8-1　分装感受态细胞时每组两人合作完成





2. 改良 Hanahan 法

此法是在 $CaCl_2$ 法基础上发展而成，转化率是普通 $CaCl_2$ 法的 10~100 倍。

Materials

(1) 高速离心机
(2) 离心管
(3) SOB 培养基(附录一)
(4) 二甲亚砜(DMSO)
(5) TB 缓冲液

PIPES	0.6 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.44 g
KCl	3.72 g

加双蒸水至体积 180 mL，然后用 KOH 调 pH 至 6.7，再加 2.18 g 的 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$，再加双蒸水至体积 200 mL。过滤灭菌后分装成 27 mL 或 6.4 mL 小管，保存于 4℃冰箱中

Protocols　　Time：2~4 d (操作 2 h)

(为防止污染，在超净台上操作！)

ⓐ 挑 37℃下 LB 平板上培养 16 h 的新鲜单菌落 4~5 个，转至 1 mL SOB 溶液中，搅动均匀。

↓

ⓑ 取上清转至 100 mL SOB 培养液，18℃旋转培养至 A_{600}=0.5 (约 30 h) [a]。

↓

ⓒ 在冰上冷却培养物 10 min。

↓

a. 注意低温是非常重要的条件，转化率高低绝对取决于低温！所以培养时的温度、测 OD 时及后面所有的操作的温度都非常重要！

ⓓ 分装至两预冷离心管，平衡，5000 r/min 离心 10 min (4℃)[b]。

↓

ⓔ 去上清。尽可能完全地去除上清。

b. 注意转子应预冷到 0~4℃ (空转几分钟)!

↓

ⓕ 加 27 mL 预冷 TB，充分混匀，合并两管。

↓

ⓖ 冰上放置 10 min。

↓

ⓗ 同上，离心去上清。

↓

ⓘ 加 6.4 mL TB 再次悬浮沉淀，冰上放置 10 min。

↓

ⓙ 加 0.48 mL DMSO，搅匀，快速回到冰上，放置 10 min 以上。

↓

ⓚ 分装，每管 0.1 mL，−70℃或液氮中保存备用。

↓

ⓛ 用已知浓度质粒进行转化，计算转化率。

3. 电转化法

用电转化法制作感受态细胞比 $CaCl_2$ 法稳定、转化率高，但费用较高。

Materials

(1) 摇床
(2) 高速离心机
(3) 灭菌 500 mL 离心管
(4) 灭菌 40 mL 离心管
(5) LB 培养基(附录一)
(6) 预冷无菌水
(7) 预冷无菌 10%甘油

Protocols　　Time：14 h

ⓐ 从铺有大肠杆菌的平板中挑选一个单菌落，接种于 10 mL LB 培养基中，37℃振荡过夜(预培养)。

↓ O/N

ⓑ 在 2 瓶 400 mL LB 培养液中分别接种 4 mL 预培养菌，振荡培养至 A_{600}=0.5~0.8 (2~4 h)。

↓

ⓒ 准备以下预冷用品。

- 500 mL 离心管 2 支→冰上预冷
- 40 mL 离心管 2 支→冰上预冷
- 1.5 mL Eppendorf 管 60 支→−20℃预冷(预冷前做标记：制作日期、菌株名等)

↓

ⓓ 转移至预冷 500 mL 离心管中，冰上放置 30 min。

↓

ⓔ 0℃、3000 r/min 离心 15 min。

↓

ⓕ 弃上清，加 300 mL 预冷无菌水，冰上轻轻搅动以悬浮沉淀[a]。

a. 从这一步开始，所有的离心操作均不使用制动减速。

↓

ⓖ 0℃、3000 r/min 离心 15 min，弃上清。

↓

ⓗ 弃上清，加 100 mL 预冷无菌水，冰上轻轻搅动以悬浮沉淀。

↓

ⓘ 0℃、3000 r/min 离心 15 min，弃上清。

↓

ⓙ 每管中加预冷无菌 10%甘油 4 mL，冰上轻轻搅动以悬浮沉淀，转入事先预冷的 40 mL 离心管中[b]。

b. 在这步中合为一管。

↓

ⓚ 0℃、5 000 r/min 离心 15 min，弃上清。

↓

ⓛ 加 2.4 mL 预冷灭菌 10%甘油，冰上轻轻搅动悬浮沉淀[c]。

↓

ⓜ 分装至预冷 Eppendorf 管中，每支 40 μL，保存于 −70℃[d]。

c. 细胞浓度约为 1×10^{10}~3×10^{10} 个/mL。
d. 电转化所用感受态，不须液氮速冻。−70℃冰箱中可保存半年。

第二节 转　　化

1. 与 $CaCl_2$ 法及改良 Hanahan 法对应的转化

制备感受态细胞后，一般要先测定转化率(吸取外源 DNA 的能力)。常用 0.1~1 ng 的 pBR322 为转化标准质粒。

Materials

(1) 恒温培养箱(37℃)
(2) 42℃恒温水浴锅
(3) 感受态细胞
(4) 标准浓度质粒[a]
(5) SOC 培养基(附录一)

a. 用 0.1 μg/μL pBR322 稀释至 0.1 ng/μL，取 2~5 μL 测定转化率。

Protocols　　Time：约 1.5 h

ⓐ 在冰上将感受态细胞(100 μL/支)化冻[b]。

b. 不可用手温来化冻。

↓

ⓑ 小心加入质粒 2~5 μL。

↓

ⓒ 冰上静置 30~60 min [c]。

↓

ⓓ 42℃水浴锅中热激 30~90 s [d]。

↓

ⓔ 迅速转移至冰上，静置 2~3 min [e]。

↓

ⓕ 加 900 μL 42℃的 SOC，37℃保温 30~60 min [f]。

↓

ⓖ 涂布于平板上 [g]。

c. 质粒与大肠杆菌接触时间越长越好。

d. $CaCl_2$ 作用于细胞膜，使通透性增大。在热击作用下，附着于大肠杆菌表面的质粒 DNA 进入细胞内。热击时间决定于管壁厚度与菌株种类。

e. 骤冷。

f. 不是为了细胞繁殖，而是为了使抗性基因得以表达，赋予大肠杆菌以抗性，因此时间不可过长。

g. 一般取 0.1 mL 涂布。但连接的重组体 DNA 转化大肠杆菌，最好是离心后去掉部分上清，将沉淀重悬后全部加入以增加菌落数。

2. 电转化

其原理是利用瞬间高压使细胞壁产生小孔而接受外源 DNA。其转化率比普通 $CaCl_2$ 法高 100~1000 倍，但操作中需要将 DNA 溶液中的盐分全部去掉，否则因盐分而产生高电流，高电流产生火花而杀死大肠杆菌。脱盐一般采用乙醇沉淀 DNA 的方法。

Materials

(1) 恒温箱(37℃)

(2) 电转化仪(Bio-Rad 公司，图 8-2)

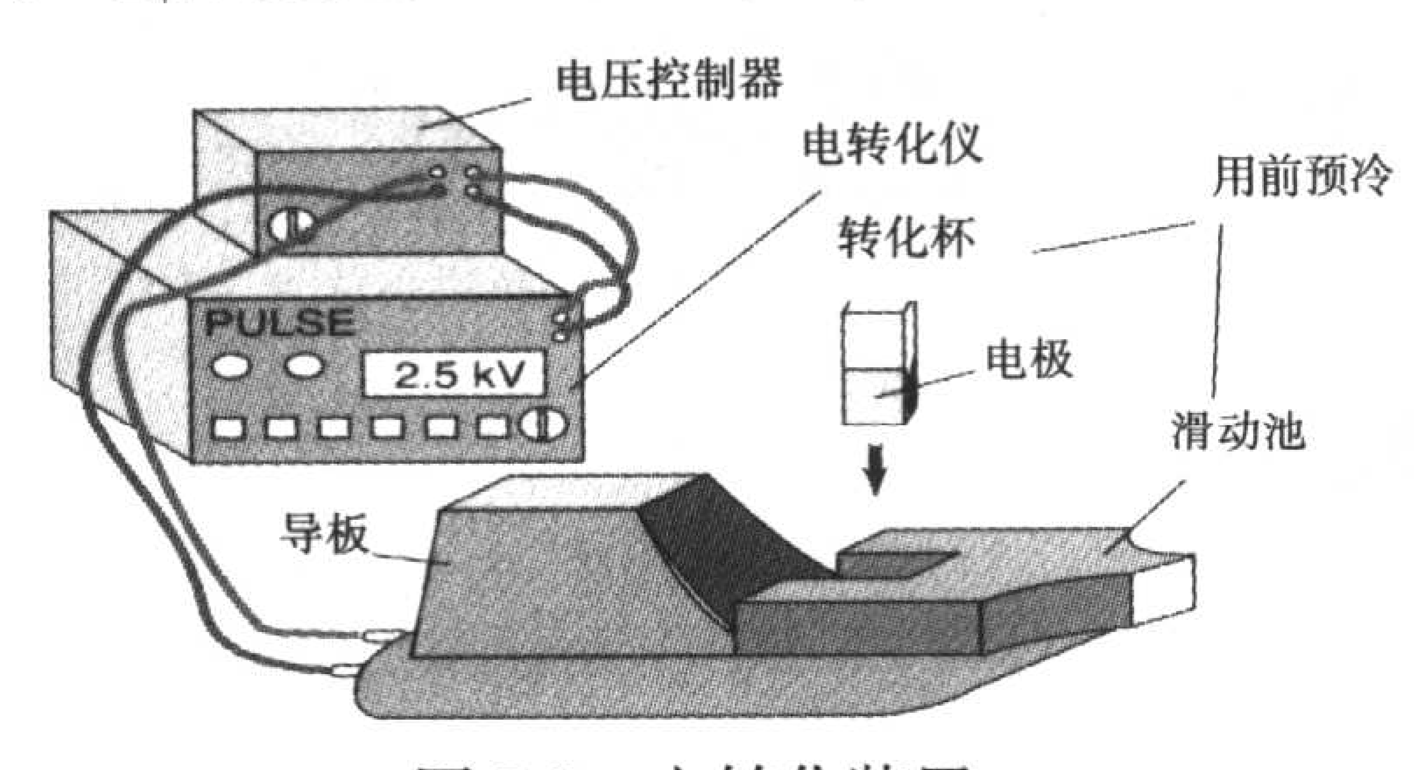


图 8-2　电转化装置

(3) 转化杯

(4) SOC 培养基(附录一)

(5) 感受态细胞

(6) 质粒 DNA 溶液 [a]

a. 乙醇沉淀后，再漂洗去盐，溶解于无菌水中，浓度为 5 pg/μL ~0.5 ng/μL。

Protocols　　　　Times：约 50 min

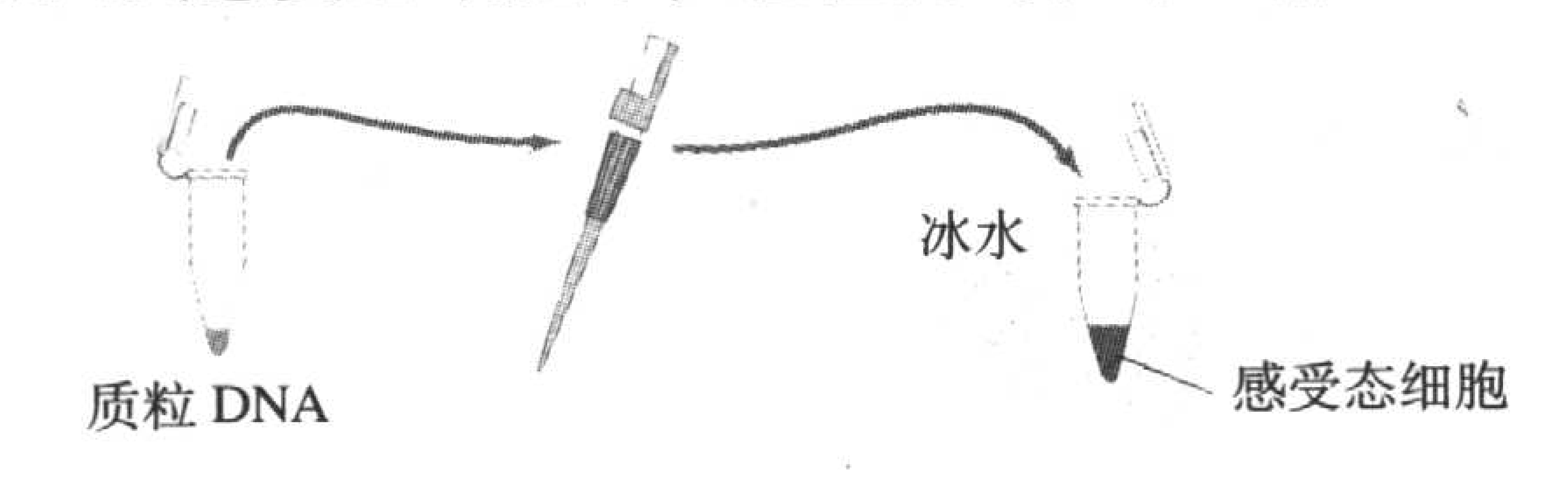
ⓐ 感受态细胞(40 μL)于冰上化冻。

↓

ⓑ 同时预冷转化杯和滑动池。

↓

ⓒ 取 1~2 μL 质粒 DNA 加入到感受态细胞中，轻轻混匀，冰上静置 5 min。



↓

ⓓ DNA 溶液/感受态细胞转移至转化杯中，轻轻晃动使之落入转化杯底部。

↓

ⓔ 装入转化杯和滑动池，按电击开关按钮[b]。

转化杯

冰

使感受态细胞和质粒进入转化杯底部

○ ×

b. 转化参数通常为 25 μF、2.5 kF、600 Ω (JM109)或 800 Ω (HB101)，时间常数设为 12 以上(低于该参数，可能电流过大，杀死细菌)。

开关

PULSE

2.5 kV

电极

若产生火花,则应重做

↓

ⓕ 迅速加 1 mL 预热至 37℃的 SOC 溶液，并转移至 Eppendorf 管中，37℃保温 30~60 min。

↓

ⓖ 以下操作与 $CaCl_2$ 法ⓖ相同。

…Questions………………

1. 感受态细胞在生理上与普通细胞有何差异？这种差异对转化外源 DNA 有什么特别作用？
2. 除了本书介绍的 3 种转化法外，还有很多方法，你知道哪些？你最喜欢哪种转化法？为什么？
3. 制备的感受态细胞如何保存？在制备感受态细胞时常使用甘油、DMSO 等试剂，其作用分别是什么？
4. 如何计算转化率？影响转化率的因素都有哪些？转化过程中尤其应注意哪些影响因素？
5. 在转化实验中，涂平板前需要在 37℃下振荡培养 30~60 min，请说出这一实验步骤的目的。
6. 电转化的原理是什么？为什么其转化率高于 $CaCl_2$ 法及改良 Hanahan 法？

第九章　扩增与提取噬菌体 DNA

第一节　噬菌体生活史

噬菌体为感染细菌后并使细菌裂解的一种病毒，多由正 12 面体头部及各种形状的尾部所组成，也有纤维状形态的，图 9-1 是其生活史。

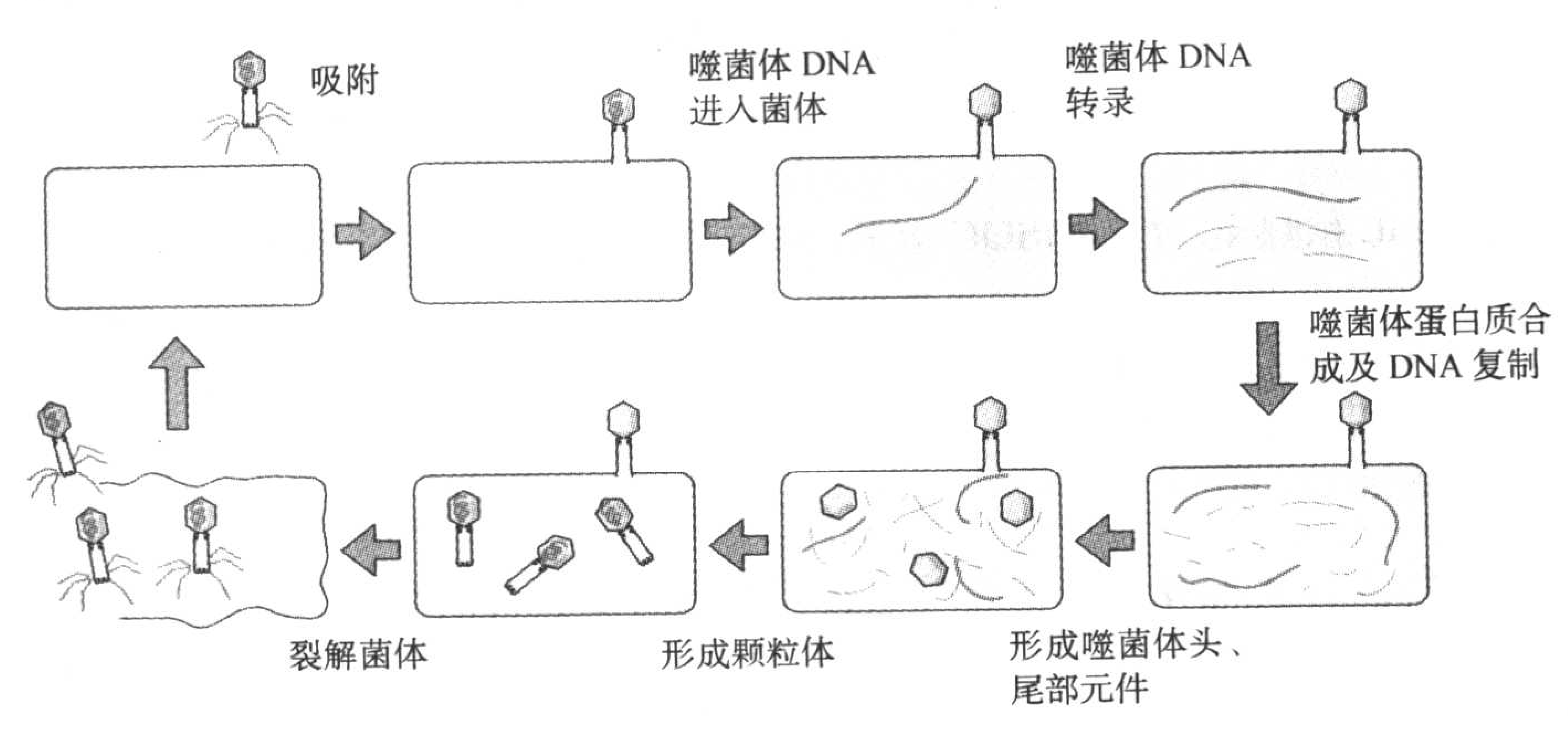


图 9-1　噬菌体生活史

噬菌体广泛应用于基因复制、表达调控等领域，尤其作为基因文库的载体更是具有其特殊价值。λ 噬菌体和 M13 噬菌体是常用的两种噬菌体。λ 噬菌体有许多改造型，是最早使用的克隆载体，多用于构建文库，基因组长 48 502 bp。λ 噬菌体颗粒内的 DNA 为双链线状分子，两端有长 12 nt 互补单链。M13 噬菌体基因组为 5407 nt 单链闭环 DNA，属于大肠杆菌丝状噬菌体。

第二节　感染力测定

将噬菌体裂解物与大肠杆菌混合，固定在琼脂培养基中，感染上的噬菌体将裂解大肠杆菌，从而产生肉眼可见的噬菌斑，根据噬菌斑数可计算噬菌体包装体数(plague forming unit：pfu)。

Materials

(1) 热板(47℃)
(2) 恒温箱(37℃)
(3) 微量移液器
(4) LA 琼脂培养基(附录一)
(5) NZYM 顶层琼脂培养基(附录一)

Protocols　　Time：7~8 h (操作 1 h)

ⓐ 0.1 mL 过夜培养的大肠杆菌($Y109r^-$)[a]与 0.1 mL 稀释噬菌体裂解液[b]混合，室温下放置 20 min(噬菌体吸附)。

a. 不同噬菌体对应宿主不同，λgt11 宿主菌为 $Y109r^-$。
b. 稀释倍数过高，看不见噬菌斑；稀释倍数过低，噬菌斑数过多，无法计数。

↓

ⓑ 将装有 NZYM 培养基的离心管置于 47℃热板上(图 9-2)。

↓

ⓒ 准备保温的平板。

↓

ⓓ 将ⓐ的噬菌体/大肠杆菌混合液加至ⓑ的离心管中，轻轻混匀。然后，迅速均匀地铺在ⓒ的平板上(图 9-2)。

↓

ⓔ 待顶层培养基完全凝固后移至 42℃恒温箱中[c]。

↓

ⓕ 待噬菌斑长至肉眼可见时，计数，并计算感染力(单位为 pfu/mL)。

c. 保温过程中，凝结在盖子上的水珠可能滴下来而影响结果的观察。因此培养时应半开着盖子，使产生的蒸汽挥发出去。但也应注意防止产生污染！

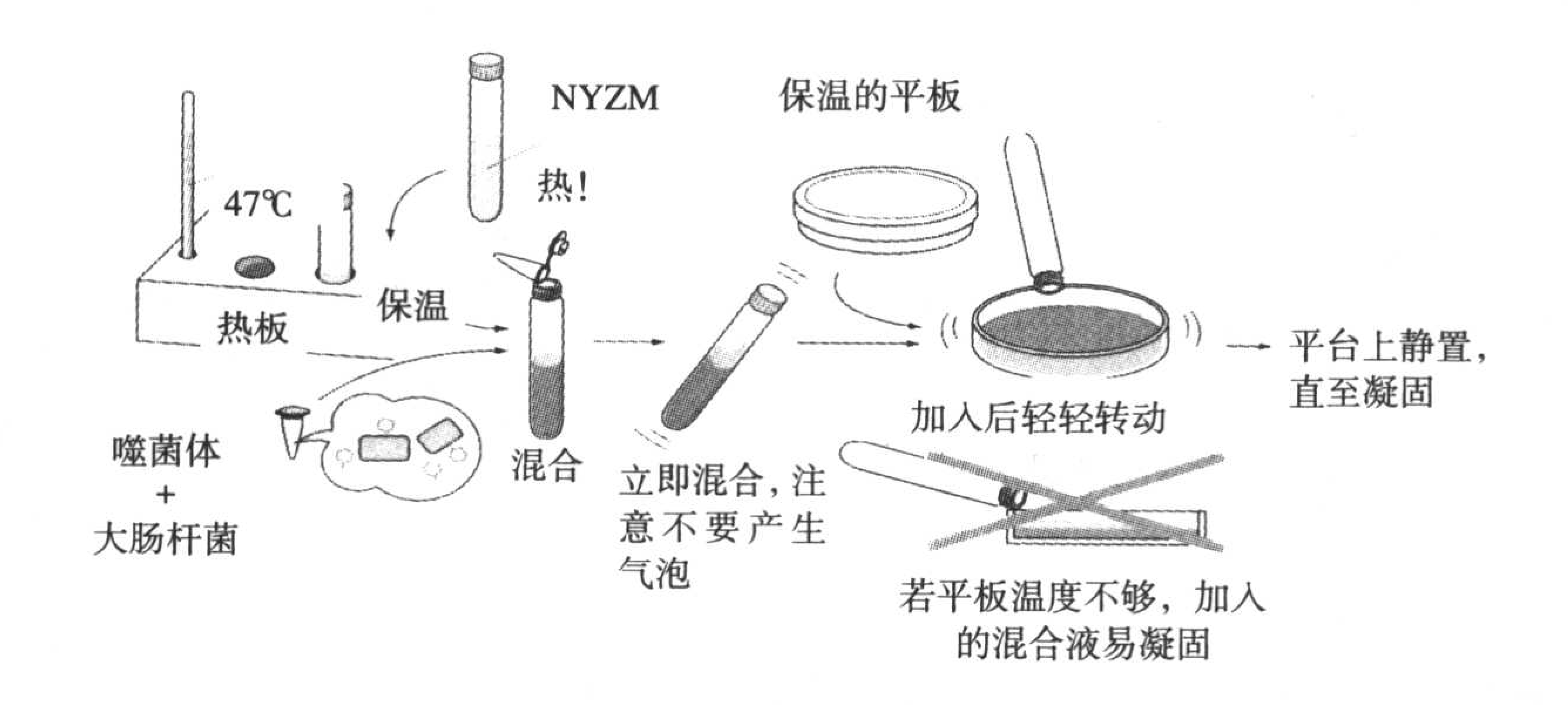


图 9-2　顶层培养基配制流程

第三节　噬菌体回收与繁殖

从平板众多噬菌斑中筛选到需要的噬菌斑后，接下来的工作就是分离噬菌体并加以繁殖。

Materials

(1) 保温摇床(37℃)
(2) 氯仿
(3) NYZM 培养基(附录一)
(4) SM 缓冲液(附录一)
(5) 过夜培养的大肠杆菌(如 $Y109r^-$)
菌体收集后，加培养基量一半的 10 mmol/L $MgSO_4$ 溶液悬浮菌体

1. 从噬菌斑中回收噬菌体

Protocols Time：30 min

ⓐ 根据噬菌斑数准备 Eppendorf 管。加 500 μL SM 缓冲液和 20 μL 氯仿[a]于 Eppendorf 管中。

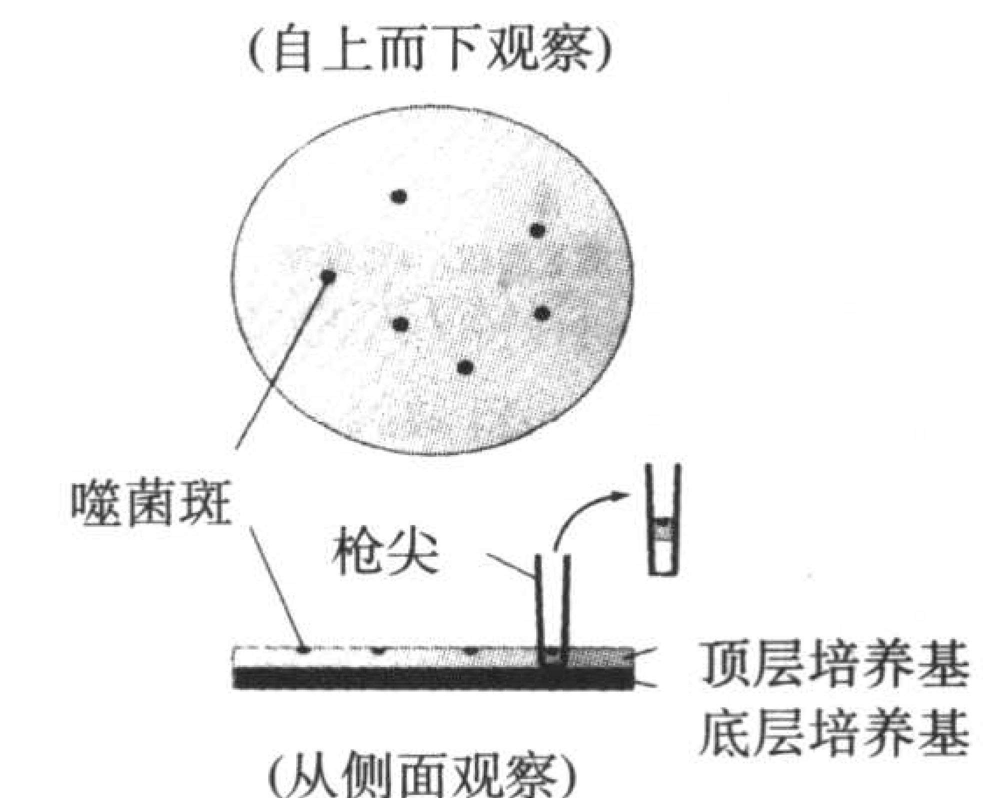
↓

ⓑ 如右图所示选择噬菌斑，将枪尖插入到顶层培养基中，吸取裂解液。

↓

ⓒ 裂解液转移至ⓐ准备的 Eppendorf 管中，旋涡混合，4℃下可保存半年。

a. 为了除菌。



2. 用液体培养基增殖噬菌体

Protocols Time：6 h

ⓐ 低速离心盛有噬菌斑的 Eppendorf 管，以使氯仿分层。

↓

ⓑ 取上清(5~100 μL[a])，与 100 μL 宿主菌悬浮液混合，室温下保温 30 min，使噬菌体感染宿主菌。

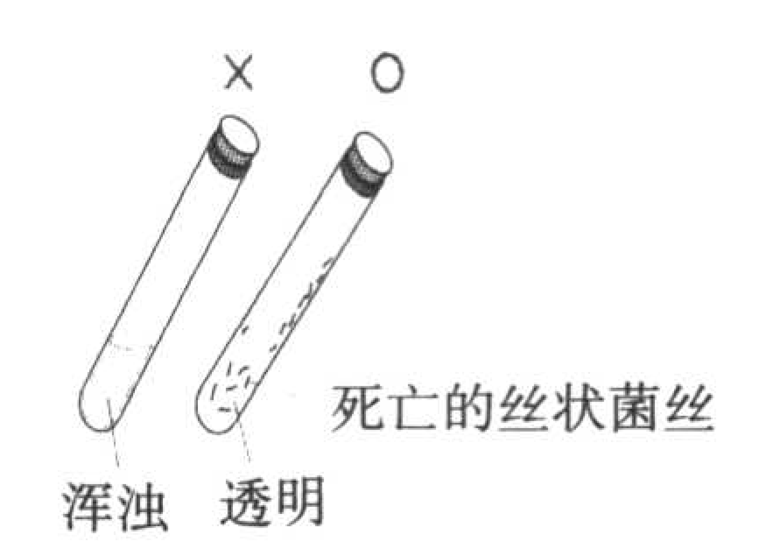
↓

ⓒ 加入到含 10 mL NZYM 的离心管中，37℃振荡培养 4~5 h。

↓

ⓓ 培养基透明后，加 100 μL 氯仿杀死大肠杆菌，回收裂解液，离心，上清保存于 4℃。

a. 取决于噬菌体与大肠杆菌的数目比。最佳比例可用透明度来观察：大肠杆菌生长过程中，菌液为白色浑浊状，待再转清时，二者比例最佳。



3. 平板裂解液法

Protocols Time：6~8 h (操作 30 min)

ⓐ 将目的噬菌体与大肠杆菌平铺于 15 cm×9 cm 的方形平板上[a]，过夜培养使之完全裂解。

↓ O/N

ⓑ 平板上铺 10 mL 10 mmol/L Tris · HCl (pH7.5)，再滴数滴氯仿，室温下振荡 90 min。

↓

ⓒ 从平板上回收裂解液，转移至 50 mL 离心管中。

↓

a. 顶层培养基最好用琼脂糖做凝固剂，以利于回收的 DNA 应用于后续试验。因为琼脂中含有较多酶抑制剂。

ⓓ 在平板上再加 4 mL 10 mmol/L Tris · HCl(pH7.5)，回收至ⓒ的离心管中。

↓

ⓔ 离心，回收上清，4℃保存。

第四节 提取噬菌体 DNA

Materials

(1) 控温培养箱(37℃)

(2) 离心机

(3) 真空干燥器

(4) 5 mol/L NaCl

(5) Tris/酚(附录一)

(6) 氯仿

(7) 0.5 mol/L EDTA

(8) 预冷 100%、70%乙醇

(9) SM 缓冲液(附录一)

(10) 7.5 mol/L NH_4Ac

(11) RNase A/DNase I

RNase A	40 mg
DNase I	10 mg
1 mol/L Tris · HCl (pH7.4)	0.1 mL
5 mol/L NaCl	0.1 mL
1 mol/L $MgCl_2$	0.05 mL
甘油	5 mL

用双蒸水定容至 10 mL，分装，保存于−20℃

(12) 20%PEG/NaCl(附录一)

Protocols　　Time：3.5 h

ⓐ 在噬菌体裂解液中加 50 μL RNase A/DNase I，37℃保温 60 min[a]。

a. 目的是降解大肠杆菌 DNA 与 RNA。

↓

ⓑ 加 1 mL 5 mol/L NaCl、1.1 g PEG6000，充分混匀后，置于冰上。

↓

ⓒ 8000 r/min 离心 15 min，弃上清，沉淀溶于 700 μL SM 缓冲液中，并转移至 Eppendorf 管中，加 500 μL 氯仿后用旋涡混合器充分混匀。

↓

ⓓ 5000 r/min 离心 10 min，上清转移至新管，加 2 μL RNase A/DNase I，37℃保温 1 h。

↓

ⓔ 加 500 μL 20% PEG/NaCl，冰上静置 30 min。

↓

ⓕ 15 000 r/min 离心 15 min，沉淀溶于 600 μL SM 缓冲液中，并充分混匀。

↓

ⓖ 加 35 μL 5 mol/L NaCl、15 μL EDTA 和 300 μL 苯酚，颠倒数次，混匀[b]。

b. 该操作是为了破坏噬菌体颗粒，游离出 DNA。由于噬菌体 DNA 较长，以后的操作应避免使用旋涡混合器等仪器。

↓

ⓗ 15 000 r/min 离心 5 min，回收水相。

↓

ⓘ 反复用 400 μL 酚/氯仿抽提至中间无蛋白质变性层。

↓

ⓙ 加 1 mL 预冷乙醇，上下颠倒混匀，4℃、15 000 r/min 离心 15 min。

↓

ⓚ 弃上清，用 70%预冷乙醇漂洗沉淀，沉淀溶于 300 μL TE 中。

↓

ⓛ 加 150 μL 7.5 mol/L NH_4AC 和 1 mL 预冷乙醇，上下颠倒混匀，4℃、15 000 r/min 离心 15 min。

↓

ⓜ 弃上清，用 70%预冷乙醇漂洗沉淀，沉淀干燥后溶于 100 μL 双蒸水中。

↓

ⓝ 用 10~20 μL 酶切体系[c]检查插入 DNA 大小。

c. 为了减少不纯物的影响，用大反应体系更合适。混入的 RNA 过多，将影响目的带的观察，在酶切体系中加 RNase A 以降解 RNA。

…Questions………………

1. 扩增与提取噬菌体 DNA 的主要目的是什么？
2. 了解噬菌体生活史对扩增与提取噬菌体 DNA 有何帮助？
3. 如何测定噬菌体的感染力？操作时应注意什么？
4. 如何回收和繁殖噬菌体？
5. 提取噬菌体 DNA 过程中为何需加氯仿？
6. 如何保存噬菌体？

第十章　提取真核生物基因组 DNA 与构建基因组文库

部分酶切基因组DNA ⟶ 电泳分离 ⟶ 部分酶切 DNA 与载体连接 ⟶ 导入大肠杆菌 ⟶ 构建基因组 DNA 文库

在基因组分析和基因组文库构建中，需要高纯度、高分子质量的基因组 DNA，其提取过程包括：

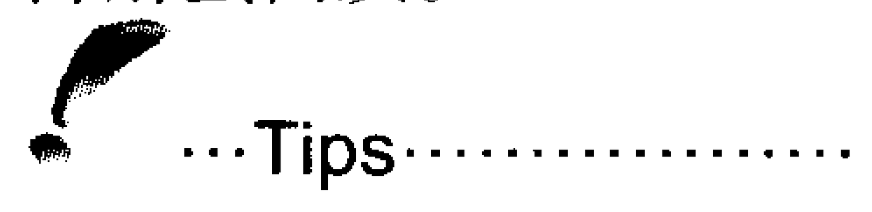
(1) 破碎细胞；

(2) 去除蛋白质、多糖、脂类等生物大分子；

(3) 去除盐类、有机溶剂等杂质；

(4) 浓缩和溶解 DNA。

基因组 DNA 在同一个体的不同组织中差别不大。鼠肝、兔肝、人血(白细胞)是提取哺乳动物基因组 DNA 最合适的材料，用鼠的尾巴也能获得高纯度基因组 DNA。对于植物而言，常用幼叶或子叶为材料。几乎所有的基因组 DNA 提取方法都使用了高浓度盐或 EDTA(也有抑制 DNase 活性的作用)等物质将蛋白质和 DNA 分开，或者用蛋白酶 K 降解蛋白质。



1. 核酸分离总原则

以下原则也适用于线粒体或植物叶绿体 DNA 的提取与纯化。

1) 完整性

完整的一级结构是分子生物学研究的最基本要求，因为全部遗传信息储存于其一级结构中。一级结构还决定高级结构的形成及与其他生物大分子结合的方式。为保证分离核酸的完整性，应注意以下几点：

(1) 尽量简化操作步骤，缩短提取过程，以减少各种有害因素对核酸的破坏。

(2) 减少化学因素对核酸的降解。如避免过酸、过碱对核酸链中磷酸二酯键的破坏，操作一般在 pH4~10 条件下进行。

(3) 注意机械剪切力、高温等物理因素对核酸的降解。机械剪切力包括强力高速的溶液振荡、搅拌，使核酸溶液快速通过狭长孔道；细胞突然置于低渗溶液中；细胞爆炸式的破裂以及 DNA 样品的反复冻融。机械剪切的主要危害对象是高分子质量线性 DNA，如真核细胞染色体 DNA。分子质量小的环状 DNA，如质粒 DNA 及 RNA，威胁相对小一些。长时间煮沸，除水沸腾带来的剪切力外，高温本身对核酸分子中的某些化学键也有破坏。提取核酸通常在 0~4℃下进行，此温度下核酸酶活性很低，可减少内源核酸酶对核酸的破坏。防止核酸的生物降解也是很重要的，细胞内外各种核酸酶消化核酸链中的磷酸二酯键，会直接破坏核酸的一级结构。由于 DNase 需要二价金属离子 Mg^{2+}、Ca^{2+}的激活，因此使用金属离子螯合剂(如 EDTA、柠檬酸盐)，可抑制 DNase 活性。RNase 分布广泛，且耐高温、耐酸碱、

不易失活，所以降解是 RNA 提取过程中尤其需要注意的。

动物细胞溶解之前用匀浆机破坏其细胞膜，此时应使用含 Mg^{2+}的缓冲液，以稳定染色质结构。缓冲液组成为：20 mmol/L Tris·HCl(pH7.5)、100 mmol/L NaCl 和 1.5 mmol/L $MgCl_2$。低速下(2000 r/min)离心 5 min，以纯化细胞核，对 DNA 的提取有帮助作用，特别是高质量基因组 DNA。

2) 纯度

尽量减少杂质污染，为此应注意以下几点：

(1) 核酸样品中不应存在对酶有抑制作用的有机溶剂和浓度过高的金属离子；

(2) 其他生物大分子，如蛋白质、多糖和脂类分子的污染应降低到最低程度；

(3) 排除其他核酸分子的污染，如提取 DNA 时应去除 RNA，反之亦然。

2. 细胞破碎方法

1) 使用捣碎机捣碎组织

将材料制成稀糊状，放置于筒内(不能超过 1/3 体积)，盖紧筒盖，将调速器先拨至最慢处，开动开关后，逐步加速至所需速度。此法适用于动物内脏组织、植物肉质种子等。

2) 玻璃匀浆器匀浆

先将剪碎的组织置于管中，再套入研杵来回研磨，上下移动，即可研碎细胞。此法适用于细胞的破碎，也适用于量少的动物脏器组织的破碎。

3) 超声波处理

用一定功率的超声波处理细胞悬浮液，使细胞急剧振荡破裂。此法多用于微生物材料，如用大肠杆菌制备各种酶，常选用浓度在 50~100 mg/mL 菌体，在 14~100 kHz 频率下处理 10~15 min。此法的缺点是在处理过程中产生热量，因此应采取降温措施。对超声波敏感的酶和核酸应慎用。

4) 反复冻融法

将细胞在−20℃下冰冻，室温融解，反复几次。由于细胞内冰粒形成和剩余细胞液盐浓度的提高而引起溶胀，使细胞结构破碎。

5) 化学处理法

有些动物细胞，如肿瘤细胞，可采用十二烷基硫酸钠、去氧胆酸钠等使细胞膜破坏。细菌细胞壁较厚，采用溶菌酶处理效果更好。

无论用哪一种方法破碎组织细胞，都会使细胞内蛋白质或核酸水解酶释放到溶液中。加入二异丙基氟磷酸可抑制或减慢自溶作用，加入碘乙酸可抑制活性中心含有巯基的蛋白水解酶的活性，加入苯甲基磺酰氟能消除部分蛋白水解酶活力。

第一节 SDS/酚法提取基因组 DNA

SDS/酚法是提取动(植)物基因组 DNA 的经典方法。其基本原理是，表面活性物质 SDS 裂解细胞，酚使游离出来的蛋白质变性，从而与水溶性 DNA 分离(图 10-1)。Trizol (Gibco BRL 公司)具有类似的作用，广泛应用于试剂盒中。

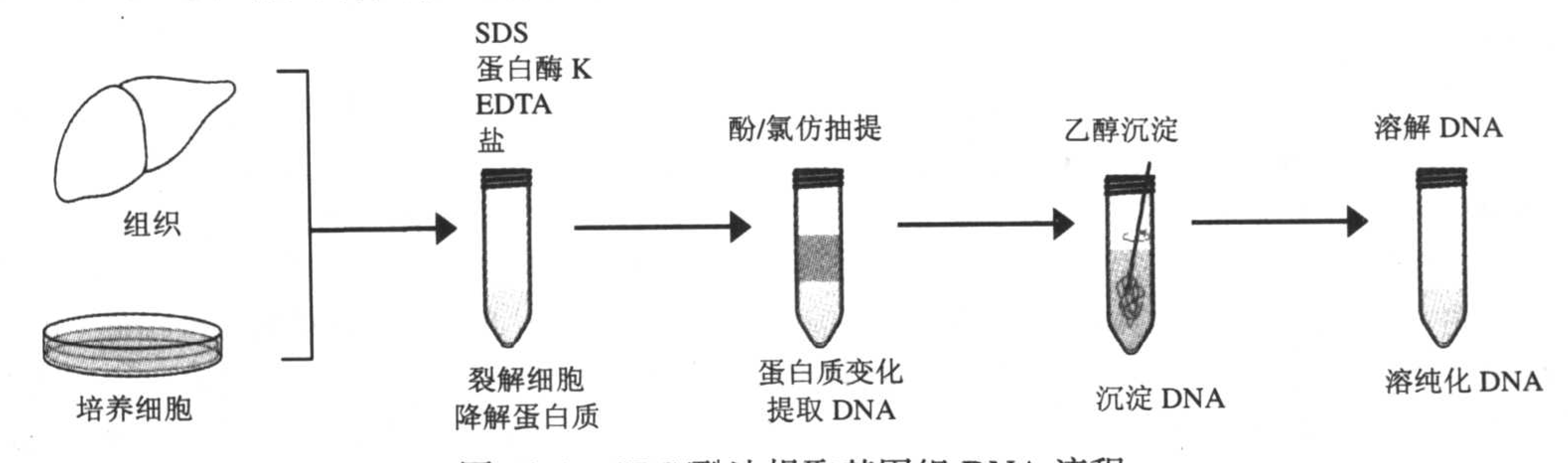


图 10-1 SDS/酚法提取基因组 DNA 流程

Materials

(1) 50 mL 离心管(带盖，聚丙烯材料)
(2) 10 mL 刻度量筒
(3) 玻璃棒
(4) 低速离心机
(5) 解剖用剪刀及手术刀
(6) 10 mg/mL 蛋白酶 K 溶液(附录一)
(7) RNase A 溶液(附录一)
(8) Tris 饱和酚(附录一)
(9) 酚/氯仿/异戊醇溶液(附录一)
(10) 裂解缓冲液

1 mol/L Tris · HCl(pH8.0) (附录一)	5 mL
5 mol/L NaCl	2 mL
0.5 mol/L EDTA	20 mL
10% SDS (附录一)	10 mL

用双蒸水定量到 100 mL

(11) 预冷的 100%乙醇和 70%乙醇
(12) TE
(13) PBS 缓冲液(附录一)

Protocols　　Time：4 d

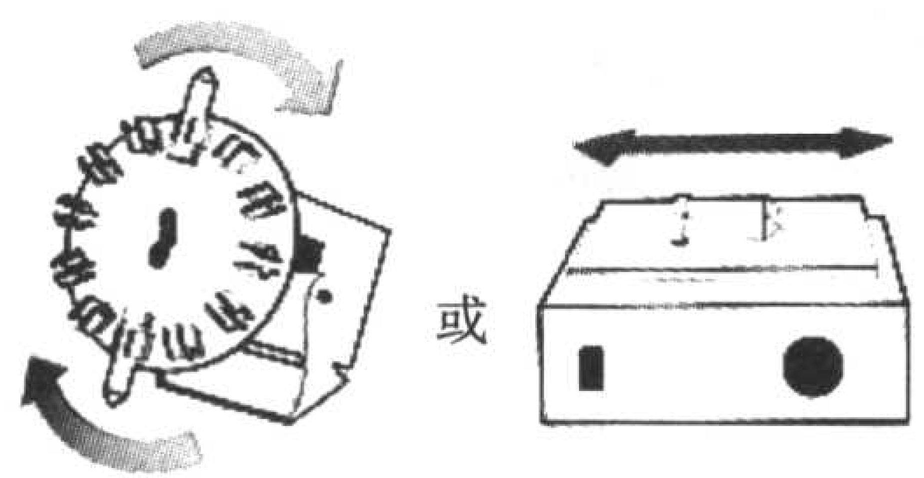
ⓐ 取肝脏组织(兔肝 1 g)，用 PBS 冲洗掉附带的血[a]。称取 1 g 放于铝箔纸上，用剪刀剪碎后移入 50 mL 离心管中[b, c]。

↓

ⓑ 加 10 mL 裂解缓冲液，再加 100 μL 蛋白酶 K 溶液，在 55℃下缓慢振荡[d] 8 h 至过夜。

↓ O/N

ⓒ 加等量 Tris 饱和酚(约 10 mL)，30 r/min 下缓慢混匀[d]，装置如图[e]。



↓

ⓓ 室温下 3000 r/min 离心 10 min 后，用宽口径吸管谨慎地吸取水相，转移至新管[f]。

↓

ⓔ 加等量酚/氯仿/异戊醇(约 10 mL)，缓慢摇 1 h 后，室温下 3000 r/min 离心 10 min。

↓

ⓕ 用宽口径吸管谨慎吸取水相，转至新管中[g]，若出现中间变性蛋白质层，则应重复上述操作。

↓

ⓖ 沿管壁谨慎地加入 20 mL(2 倍量)100%乙醇，分层。

↓

a. 可用液氮速冻后，存放于−70℃冰箱中。初始材料若为培养细胞，则离心收集(1500 r/min，5 min)，并用 PBS 冲洗一次，直接进入流程ⓑ步骤。细胞密度为 10^9 个/mL 的 1 mL 细胞与 1 g 组织的流程类似。

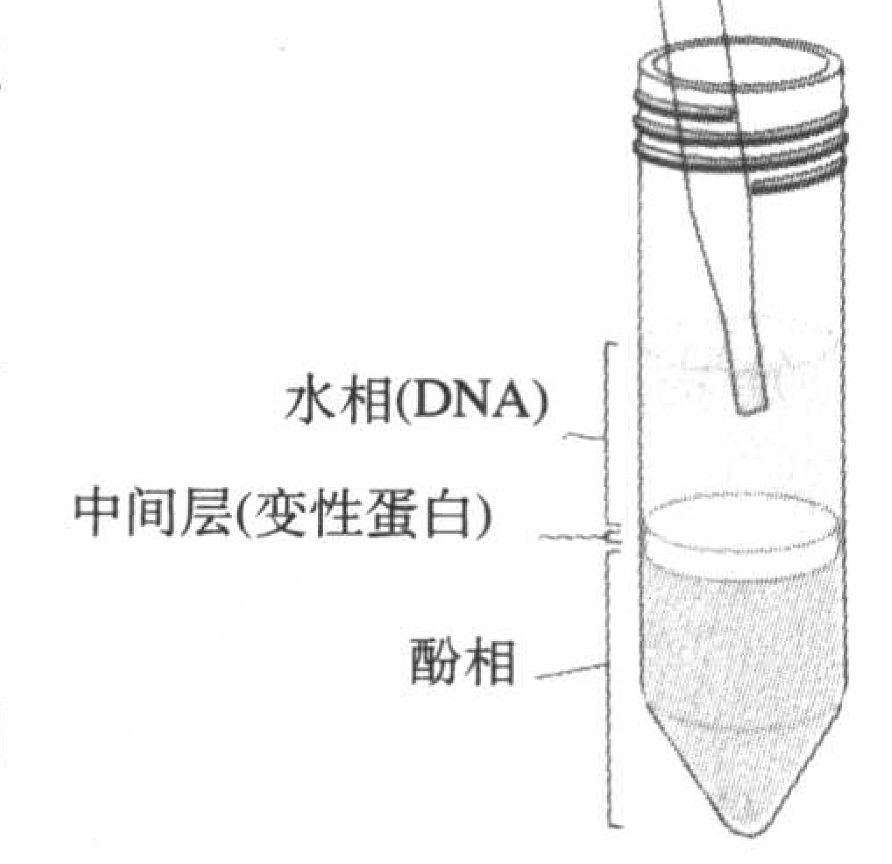
b. 若为植物叶片，取 2~3 g，用液氮研磨成粉状。

c. 冰冻保存的组织易碎，宜在低温室中操作。

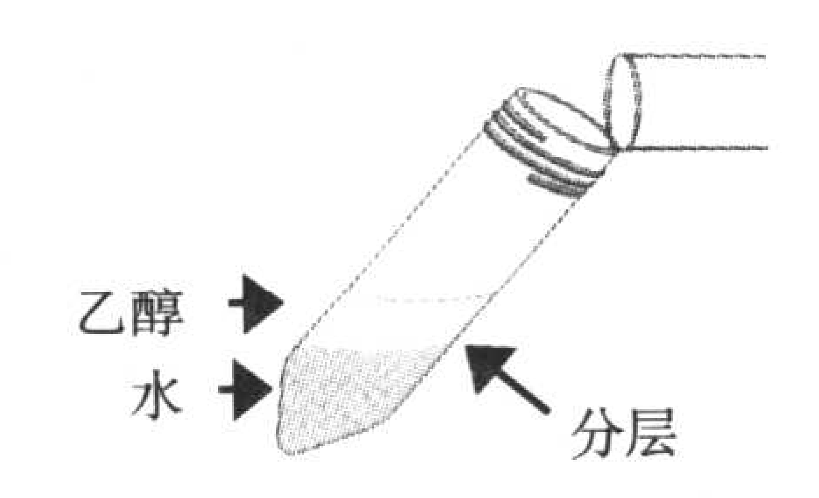
d. 往复式振荡速度为 0.5~1.0 次/s，旋转式用 10~30 r/min。

e. 注意盖严管盖。

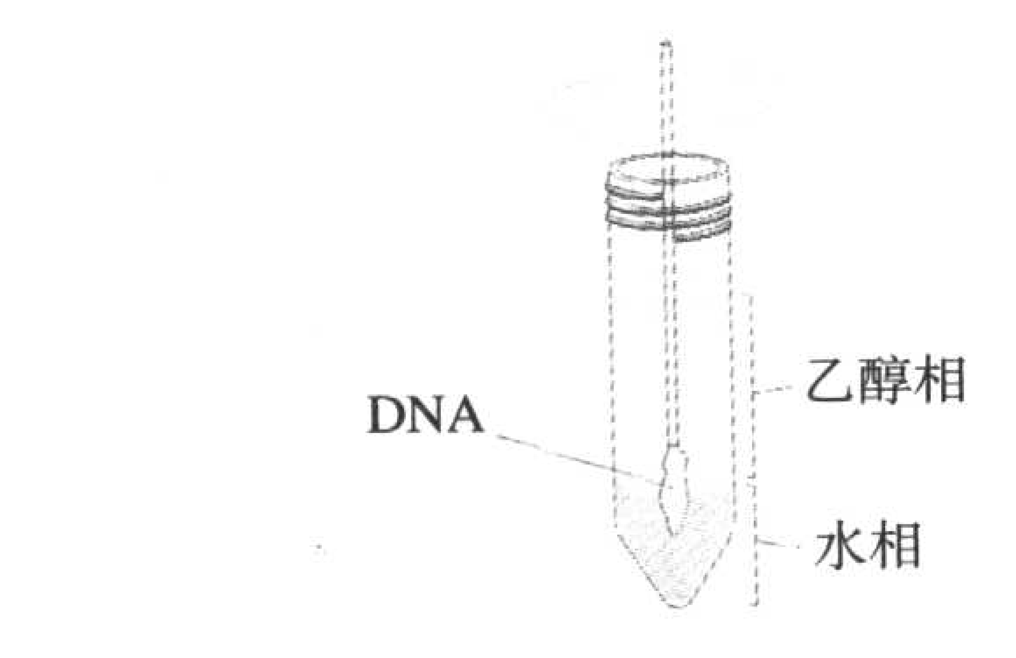
f. 上清黏度高，注意不要吸取中间变性蛋白质(下图)。



g. 可用大体积 TE(1 L)透析过夜，然后直接进入①步操作。



ⓗ 将玻璃棒插入到水相与乙醇相的界面里，旋转玻璃棒绕出析出的DNA。



↓

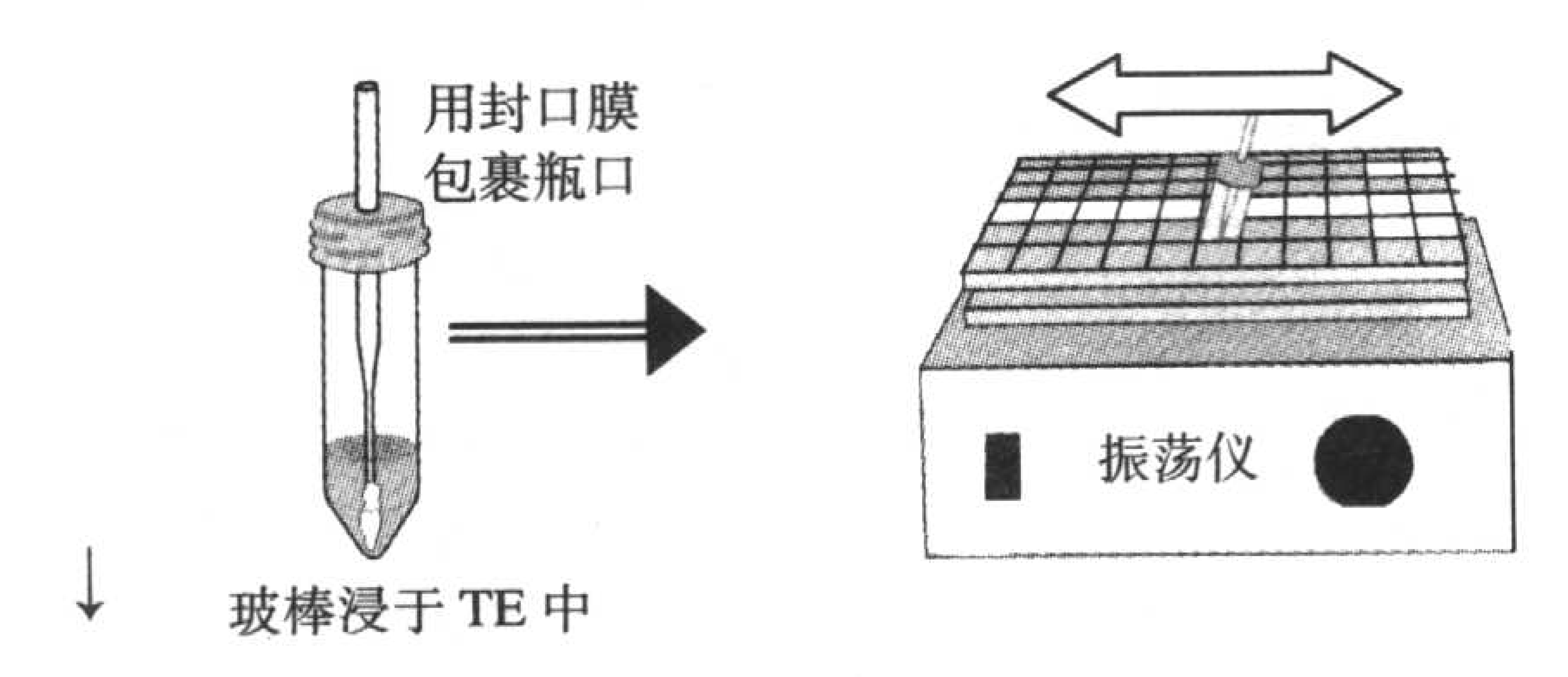
ⓘ 将绕出的DNA浸泡于20 mL 70%乙醇中30 s以漂洗DNA，然后取出，风干附着于玻璃棒上的DNA。

↓

ⓙ 在50 mL离心管中加10 mL TE，将风干的DNA浸入TE中。

↓

ⓚ 4℃下缓慢振荡过夜(10~30 r/min或0.5~1.0次/s)，以溶解DNA。



↓

ⓛ 加RNase A至终浓度40 μg/mL，37℃或60℃下温育1 h。

↓

ⓜ 重复操作ⓔ~ⓚ[h]。

↓

ⓝ 分装并保存于−20℃冰箱中，备用[i]。

h. 测OD值，计算DNA纯度和浓度。若纯度低，应反复进行去除蛋白质的操作。

i. 反复冻融易损伤DNA。可在4℃下保存数星期。1 g组织可提取出5~10 mg DNA。

第二节　试剂盒法提取基因组DNA

从大量实验材料中提取DNA是SDS/酚法的优点，但酚是有毒溶剂，操作上费时，因此从少量材料中提取DNA可用试剂盒。QIAGEN公司的DNA提取试剂盒中含有高浓度的盐分(可能是类似NaI的物质)，其原理是二氧化硅吸附DNA，以提取出DNA。

Materials

(1) 1.5 mL Eppendorf 管
(2) 55℃保温振荡仪
(3) 70℃恒温水浴锅
(4) 台式离心机(室温，可用转速为 8000~15 000 r/min)
(5) 旋涡混合器(每 10 s 间隙振荡)
(6) DNeasy Tissue Kit (QIAGEN)
含微型柱、2 mL 样品回收管、ATL 缓冲液、AL 缓冲液、AW1 缓冲液[a]、AW2 缓冲液[a]、AE 缓冲液、蛋白酶 K 溶液
(7) RNase A (附录一)
(8) 乙醇

a. 用前应按要求添加乙醇。

Protocols　　Time：10 h

ⓐ 切取 10~20 mg 组织，放入 Eppendorf 管，加入 180 μL ATL 缓冲液[b]。用剪刀剪碎组织以提高回收效率。

↓

ⓑ 加 20 μL 蛋白酶 K 溶液，55℃下保温振荡 1~3 h，使组织完全溶解掉[c]。

↓ O/N

ⓒ 旋涡混合 15 s 后，加 200 μL AL 缓冲液，立即充分混匀，70℃下保温 10 min[d]。

↓

ⓓ 加 200 μL 乙醇，充分混匀。

↓

ⓔ 将旋转柱插于 2 mL 回收管中，所有样品转入旋转柱里，离心 1 min，弃去装有滤液的样品回收管。

↓

ⓕ 将旋转柱插于新的样品回收管中，加 500 μL AW1 缓冲液。

↓

ⓖ 离心 1 min，弃去装有滤液的样品回收管。

↓

ⓗ 将旋转柱插于新的样品回收管中，加 500 μL AW2 缓冲液。

↓

ⓘ 15 000 r/min 下离心 3 min，尽可能地除去旋转柱中的水分，离心后弃去装有滤液的样品回收管。

↓

ⓙ 将旋转柱插于新的 Eppendorf 管，加 200 μL AE 缓冲液于二氧化硅膜上[e]，静置 1 min。

↓

ⓚ 离心 1 min，回收滤液，即为纯化的 DNA。

b. 应避免组织过多，超过 25 mg(脾脏为 10 mg)，DNA 产量极低。其他材料最大量分别为：鼠尾 0.6~1.2 cm，兔尾 0.6 cm，培养细胞 5×10^6 个，细菌 2×10^9 个，酵母 5×10^7 个。

c. 保温时间因样品状态而不同，间隙式旋涡混合的回收率高，黏度过高的材料应延长蛋白酶 K 处理时间和加大酶量，鼠尾材料一般保温 6 h。

d. 加 AL 缓冲液后应立即混匀，避免溶液出现沉淀，这点非常重要。

e. 若想 DNA 浓度高一些，则加 100 μL AE 缓冲液。

…Tips………………

若想彻底去除 RNA，应进行 RNase A 处理。在步骤ⓑ结束后，加 4 μL RNase A，混匀，室温保温 2 min。肝脏等组织中含有极丰富的 RNA。

第三节　CTAB 法提取基因组 DNA

Materials

(1) 恒温水浴锅(60℃)
(2) 50 mL 离心管(带盖，聚丙烯材料)
(3) 台式离心机(室温，可用转速为 8000~15 000 r/min)
(4) 旋涡混合器(每 10 s 间隙振荡)
(5) 1.5 mL Eppendorf 管
(6) 液氮
(7) 3 mol/L NaAc(pH5.2) (附录一)
(8) 2% CTAB 提取缓冲液

CTAB	2%(*m/V*)
Tris · HCl	100 mmol/L(pH8.0)
EDTA	20 mmol/L(pH8.0)
NaCl	1.4 mol/L

(9) 氯仿/异戊醇溶液(附录一)
(10) RNase A(附录一)
(11) 预冷 100%、70%乙醇

Protocols　　Time：2 d

ⓐ 收集幼嫩植物叶片 10~15 g。

↓

ⓑ 将水浴锅温控钮调至 60℃，预热 CTAB 提取缓冲液。

↓

ⓒ 液氮研磨幼叶，研磨的粉末转移至 10 mL 预热 CTAB 提取缓冲液中，60℃下不时晃动离心管，保温 1 h。

↓

ⓓ 冷却片刻,加入 10 mL 氯仿/异戊醇(24∶1),剧烈振荡离心管,10 000 r/min 离心 15 min。

↓

ⓔ 上清转入装有 25 mL 100%乙醇的新离心管，轻柔地颠倒混匀。

↓

ⓕ 10 000 r/min 离心 15 min，弃上清，得到 DNA 沉淀。

↓

ⓖ 加 700 μL 70%乙醇、70 μL 3 mol/L NaAc 溶液以漂洗 DNA 沉淀，然后转至 1.5 mL Eppendorf 管。

↓

ⓗ 10 000 r/min 离心 30 s。

↓

ⓘ 再用 70%乙醇漂洗 DNA 沉淀，离心 30 s，弃上清。

↓

ⓙ 室温下挥发乙醇。

↓

ⓚ 加 500 μL TE，4℃过夜溶解 DNA。

↓ O/N

ⓛ 加 4~10 μL RNase A，颠倒混匀，并在 55℃下保温 30~60 min。

↓

ⓜ 加 1.25 mL 乙醇、54 μL NaAc，沉淀 DNA。

↓

ⓝ 离心 30 s，室温下挥发乙醇。

↓

ⓞ DNA 沉淀溶解在 300 μL TE 中。

↓

ⓟ 分光光度计测定 DNA 浓度。

↓

ⓠ 限制性内切核酸酶消化基因组 DNA，以检测 DNA 纯度(图 10-2)。

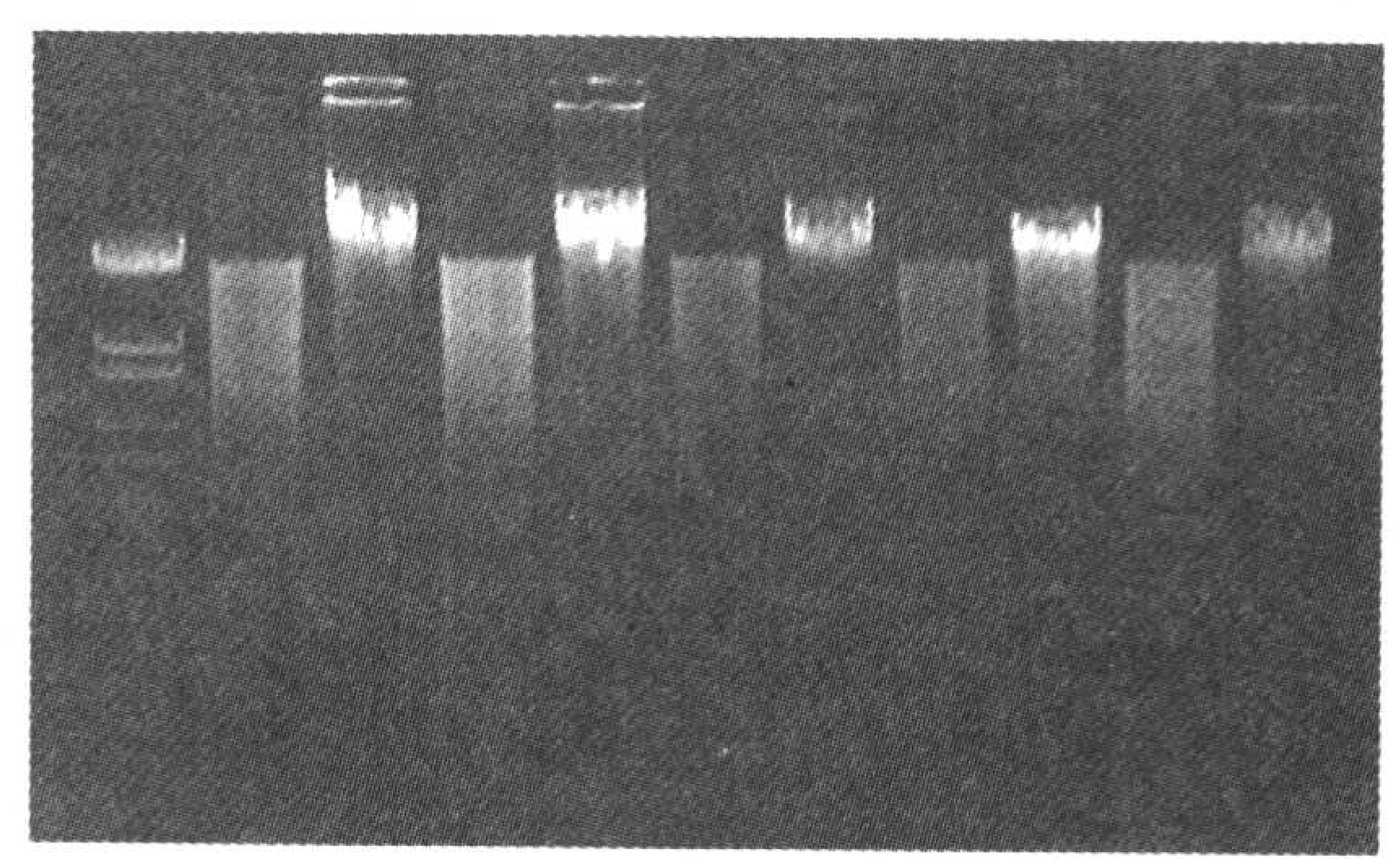


图 10-2　限制性内切核酸酶消化植物基因组 DNA

左边为 λ/*Eco*T14 I 消化 DNA Marker，然后自左至右为不同品系大麦的 DNA 及 *Eco*R I 消化产物

第四节　构建基因组 DNA 文库

基因组 DNA 文库构建的基本步骤见图 10-3。

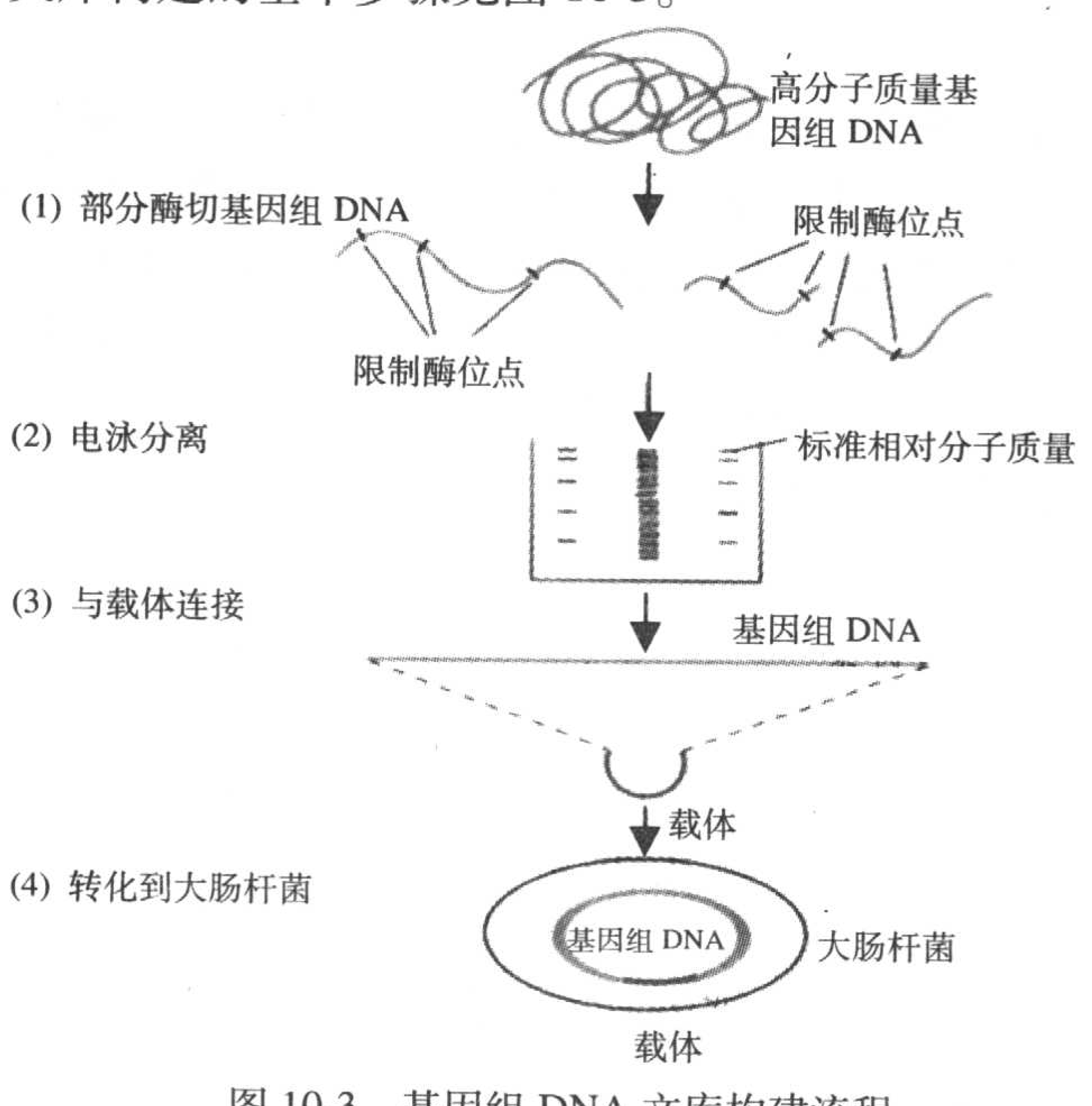


图 10-3　基因组 DNA 文库构建流程

Protocols　　　　Time：6 h

ⓐ 用限制酶部分消化高分子质量基因组 DNA：

制备细胞悬浮液，细胞浓度为 10^8 个/mL

↓

与等量 1%低熔点琼脂糖(PBS 缓冲液)混匀，取名为“琼脂糖块”[a]

↓

50℃下，蛋白酶 K(2 μg/μL)消化琼脂糖块 2 天

↓

用限制酶缓冲液对琼脂糖块透析，然后用限制酶对琼脂糖块部分消化

↓

a. 为防止机械力剪碎 DNA 而用琼脂糖固定细胞。

ⓑ 脉冲电泳分离基因组 DNA：

进行低熔点琼脂糖脉冲电泳，切胶回收适当大小的 DNA(黏粒载体：35~45 kb；P1 载体：70~100 kb；PAC 载体：130~150 kb；BAC 载体：120~300 kb；YAC 载体：250~400 kb)

↓

65℃熔化琼脂糖，用降解琼脂糖的酶(如 GELase)消化琼脂糖

↓

ⓒ 基因组 DNA 与载体连接：

100~300 ng 基因组 DNA 与合适载体(经酶切处理和脱磷酸化处理)连接，分子比为 10：1

↓

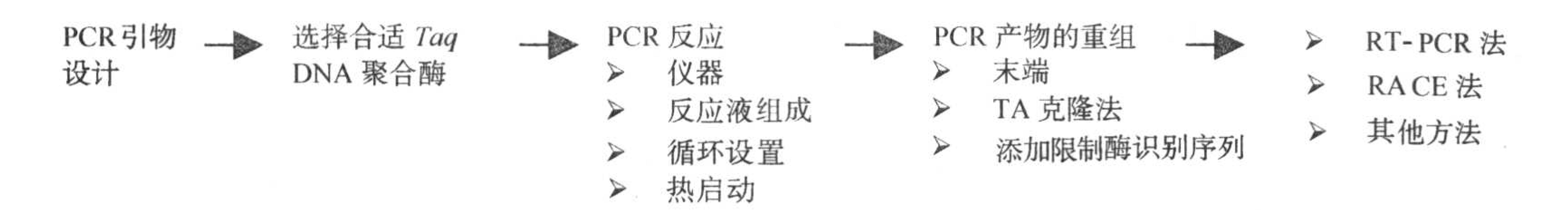
ⓓ 转化进大肠杆菌：

黏粒、P1 噬菌体用通常转染方法，PAC、BAC、YAC 等用电转化方法，转化进大肠杆菌

…Questions………………

1. 在基因组 DNA 的提取过程中应注意哪些问题？如何检测和保证 DNA 的质量？
2. 在基因组 DNA 的提取过程中，如何去除蛋白质、多糖、脂类等生物大分子？
3. 从动植物中提取基因组 DNA，最合适的初始材料是什么？为什么？
4. SDS/酚法提取基因组 DNA 的原理是什么？CTAB 法中的 CTAB 起什么作用？
5. 试剂盒法提取基因组 DNA 有哪些优越性？
6. 构建 DNA 文库时，为什么一定要用高分子质量 DNA？

第十一章　PCR 基本操作



在现代分子生物学中，最具革命性的发明之一是聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)技术的诞生与发展。所谓 PCR，即是在试管内进行的、在很短时间内大量扩增样品 DNA 的生化反应。因其操作简单而被广泛应用于生物学基础研究、医学临床诊断、食品卫生检验及刑事侦察等领域。

第一节　PCR 基本原理

PCR 过程如图 11-1 所示，以变性-退火-延伸三个基本反应步骤为一个循环，反复重复这种循环，使 DNA 得以扩增。

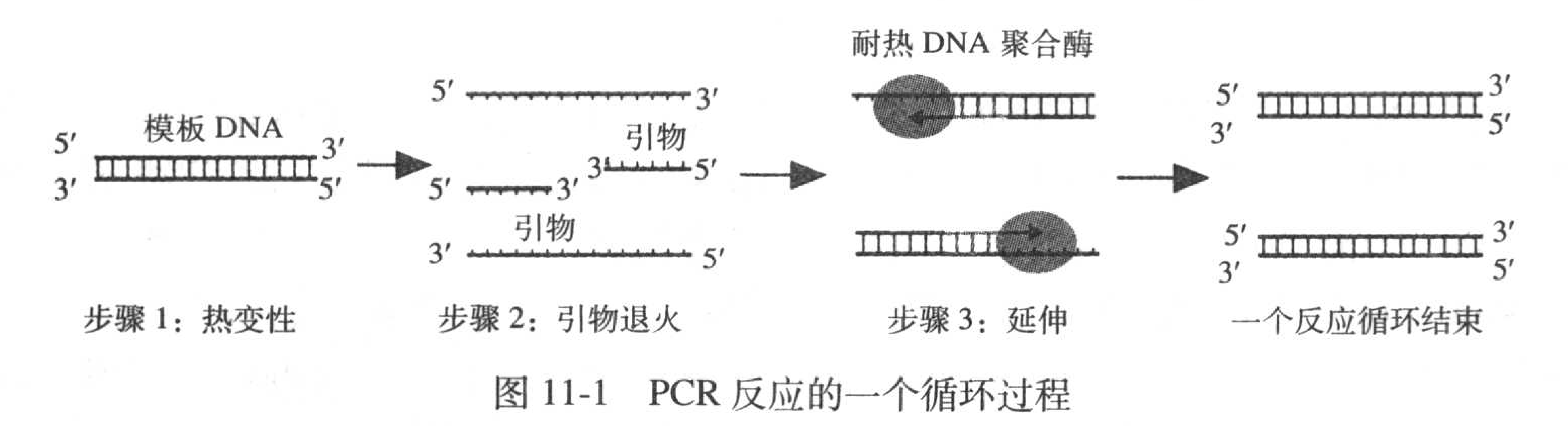


图 11-1　PCR 反应的一个循环过程

添加到反应体系中的物质有：待扩增模板 DNA、与模板 DNA 的 5′ 端及 3′ 端序列互补配对的寡聚 DNA (引物)、作为聚合酶反应底物的脱氧核糖核苷酸、耐热 DNA 聚合酶、Mg^{2+}及缓冲组分等。当体系升温到 93~95℃，双链 DNA 经热变性解离成单链(步骤

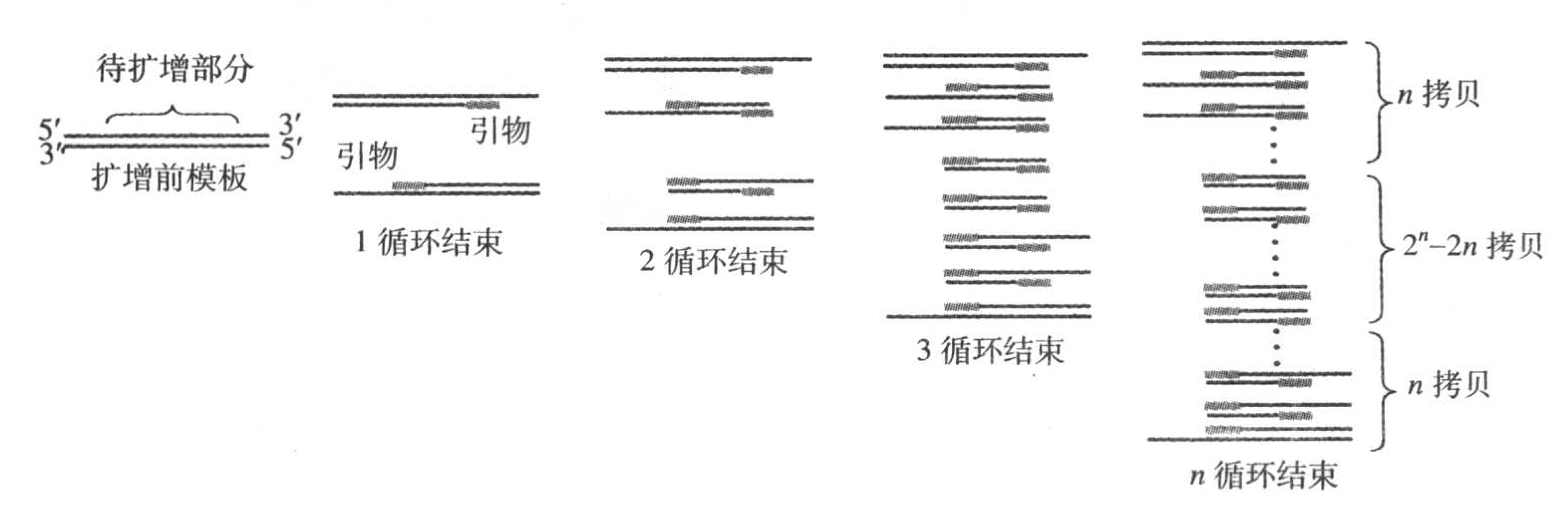


图 11-2　PCR 扩增

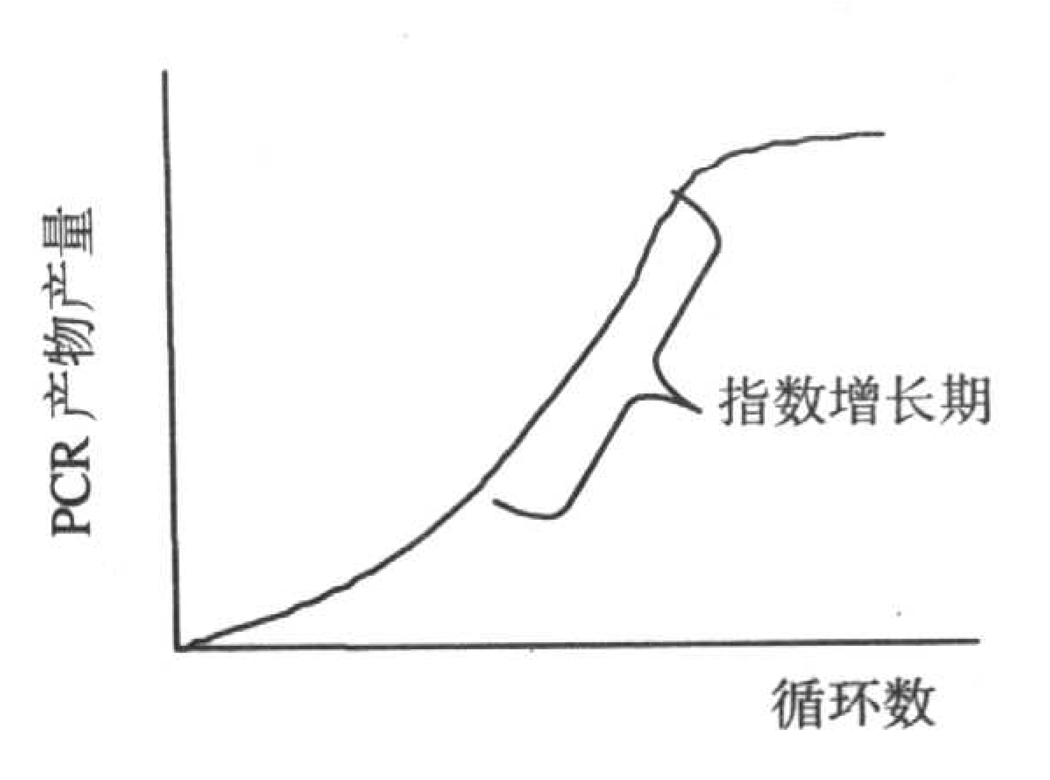


图 11-3　PCR 产物量与循环数的关系

1：热变性)；体系温度降至单链模板 DNA 与引物配对的范围时，模板 DNA 与引物配对(步骤 2：退火)；当温度升至 72℃时 DNA 聚合酶合成互补 DNA，合成的起点是引物结合位点，方向为 5′→3′，按模板 DNA 序列合成互补片段(步骤 3：延伸)。反复进行这 3 个基本步骤，一拷贝 DNA 将在理论上扩增出 2^n 个拷贝(n 为循环数)，即 DNA 片段的扩增按指数式递增(图 11-2)。实际上，许多因素影响着 PCR 扩增效率，使之出现如图 11-3 所示的扩增曲线。循环数达到一定程度后，DNA 片段的增加不再是指数而是线性增长，甚至出现零增长的平台期(个别实验中也出现负增长现象)。这是因为随着反应的延续，引物、脱氧核苷酸的浓度逐渐减少，DNA 聚合酶活性逐渐降低。在指数增长期，可根据 PCR 产物量的比较推测其模板 DNA 量的差异，这是 PCR 定量的基础。

第二节　引 物 设 计

PCR 成功与否的关键之一是引物设计，引物设计与许多因素有关。

1. T_m 值

双链 DNA 解离成单链 DNA 的温度叫熔解温度(melting temperature，T_m)。引物的 T_m 值影响着 PCR 退火温度的设置，比 T_m 值过低或过高的退火温度都不能获得满意的扩增(图 11-4)。T_m 值与 DNA 长度有关，也与 G・C 含量有关。一般而言，DNA 越长，G・C 含量越高的 DNA，T_m 值就越高，反之 T_m 就越低[a]。T_m 计算公式为：

a. G・C 间的氢键数是 3 个，A・T 间是 2 个，因此 G・C 含量越高，双链结合越紧密，熔解温度越高。

$$T_m = 81.5 + 16.6\,(\log M) + 0.41\,(\%G \cdot C) - (500/n)$$

M：Na^+、K^+和 Tris 浓度(mol/L)(Tris 浓度按 0.66 倍计算)。

n：引物碱基数

上述公式不易记住，可用下列简便公式计算 T_m 大致值：

$$T_m = 4\,(\text{G} \cdot \text{C 碱基数}) + 2\,(\text{A} \cdot \text{T 碱基数}) + 35 - 2n$$

两引物 T_m 值相差越小，PCR 成功的可能性越大，因此，设计引物时应尽可能让两引物 T_m 值一致。

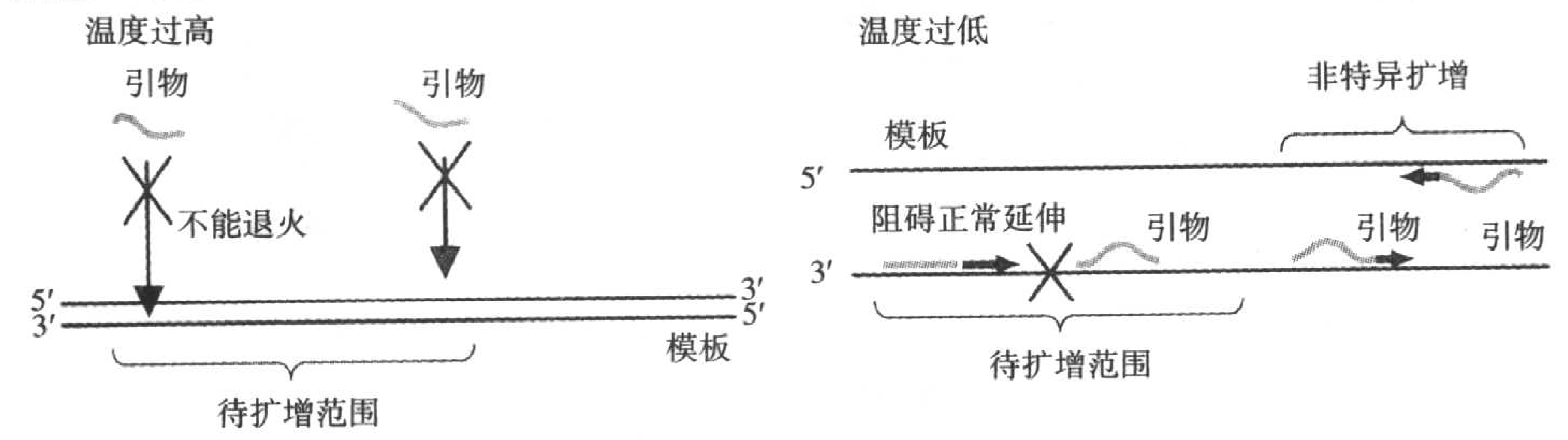


图 11-4　引物退火温度

2. 尽量避免引物配对

引物配对是指引物自身或与另一引物间产生配对，从而影响扩增的现象，如图 11-5 所示。其中，图 11-5A 最糟糕，一旦产生引物二聚体，在下一个循环中，将以此为模板进行指数扩增。引物二聚体一般是在 T_m 值低很多的温度下形成的，因此如果设计上不能避免，可选择“热启动”(hot start)方法解决(参见以后章节)。

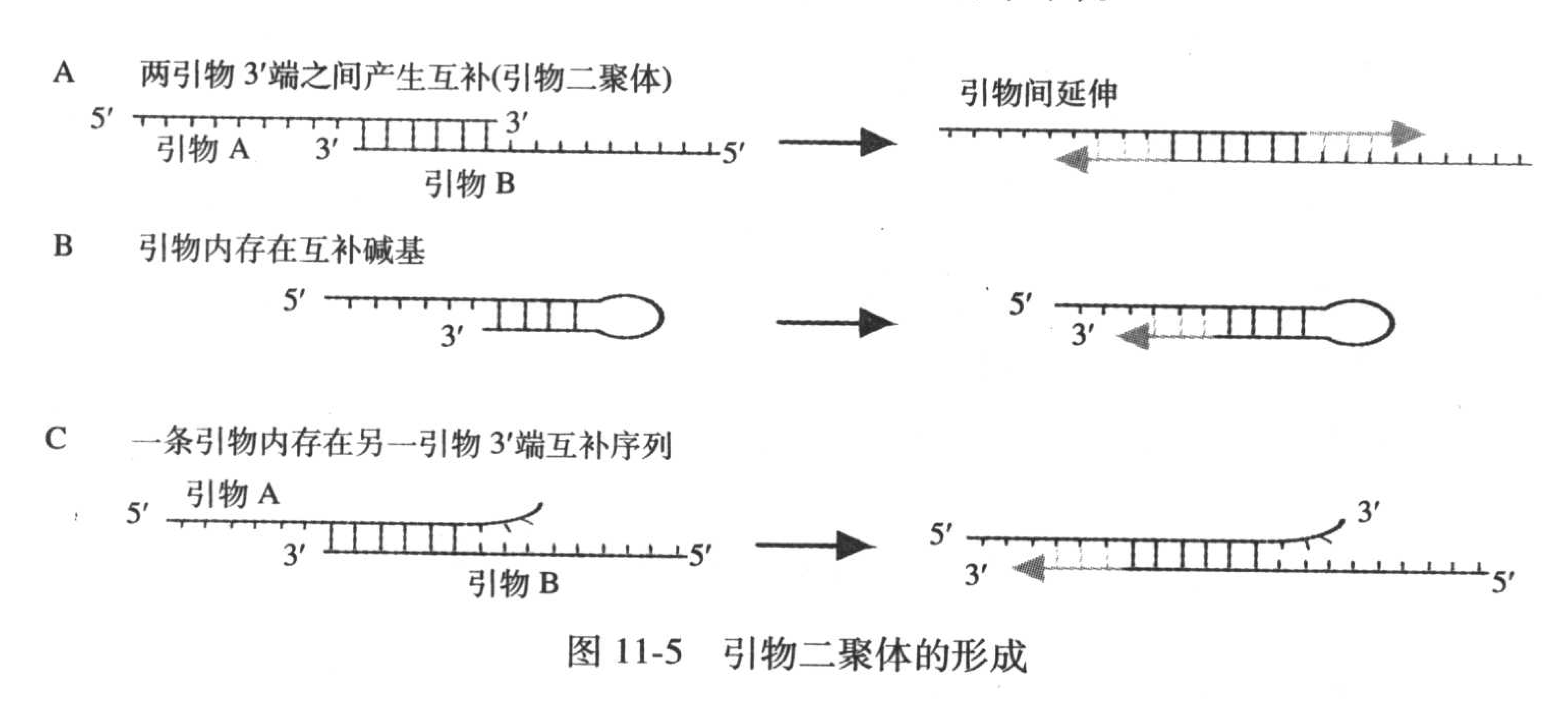


图 11-5　引物二聚体的形成

3. 其他影响扩增的因素

1) 扩增长度

经常使用的 *Taq* 聚合酶等 pol I 聚合酶或 α 型聚合酶的扩增长度在 2 kb 左右，其中 1 kb 最有效。两种类型的混合型酶(LA-PCR 酶)扩增长度稍长些。

2) 引物 3′ 端

引物 3′ 端是延伸的起点，该碱基若为 G 或 C，则与模板结合更紧密，扩增成功的可能性更大[a]。

a. 3′ 端富含 G · C 易产生非特异性扩增。

3) 避免重复序列

特别是以基因组 DNA 为模板时，应当先检查是否存在较多的引物重复序列。此外，还要避免基因组内部存在 CAG 重复序列。

4. 巢式引物

如果 PCR 反应特异性低，产生了目的带以外的条带，或一次 PCR 产量极低，则可考虑用巢式引物扩增目的条带。如图 11-6 所示，用引物 1 和引物 2 扩增，不能获得特异条带，这时可在第一次 PCR 产物内侧设计引物 3 和引物 4，再进行 PCR。由于非特异扩增条带里不存在引物 3 和引物 4 配对的区段而不能被扩增，而目的 DNA 中存在引物 3 和引物 4 配对的区段而被有效地扩增出来。这里的引物 3 和引物 4 就叫巢式引物。用巢式引物进行的 PCR 叫巢式 PCR。巢式引物未必一定要求在第一次引物扩增物的内侧，可

以与第一次引物存在部分重叠，甚至仅在 3′ 端移动几个碱基(图 11-7)。

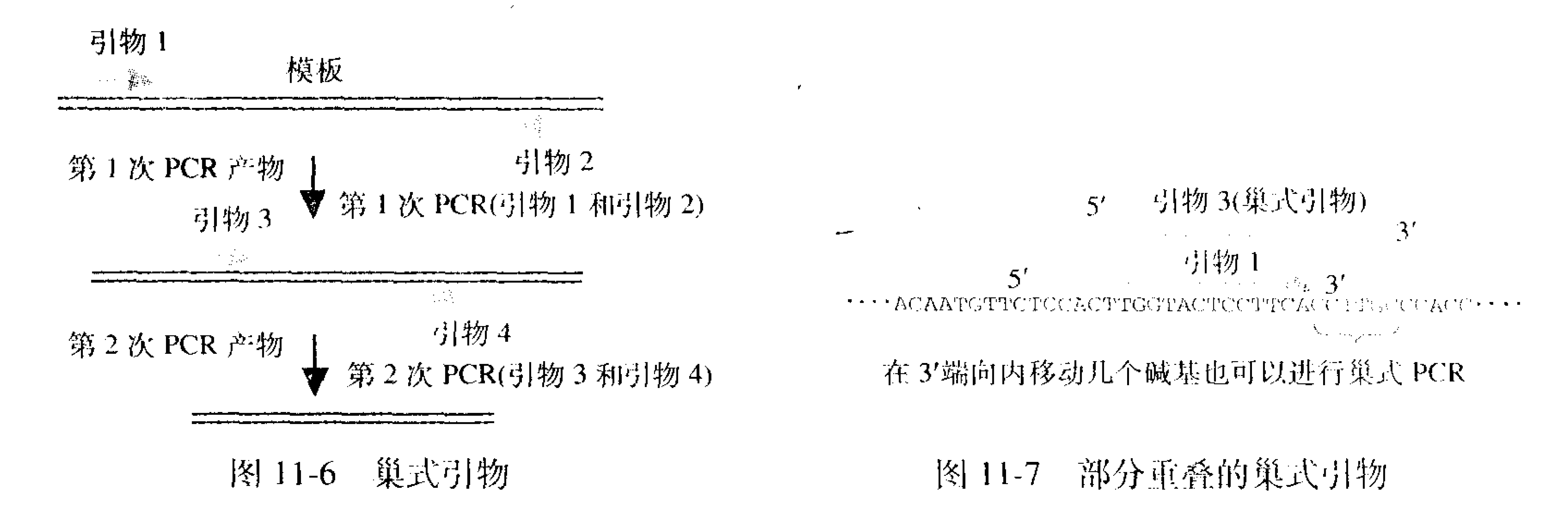


图 11-6　巢式引物　　　　图 11-7　部分重叠的巢式引物

需要注意的是，在第二次 PCR 体系中，加入过多的第一次 PCR 产物，残留的原引物将严重影响第二次扩增。一般而言，第二次 PCR 体系中加入的第一次 PCR 产物量应控制在 1/50 以下。

第三节　耐热 DNA 聚合酶

用于 PCR 扩增的耐热 DNA 聚合酶分为三大类，从细菌中分离出的 pol I 型酶、从古细菌中分离出的 α 型酶及二者混合的混合型酶。不同类型及不同商家酶的特性及反应条件也不一样，因此应了解各种酶特性后才能决定使用哪一种酶。最近新开发的“热启动 DNA 聚合酶”不属于上述三种类型。

1. pol I 型 DNA 聚合酶

pol I 型 DNA 聚合酶是从 *Thermus aquaticus* 分离出的，以 *Taq* DNA 聚合酶为代表。与 α 型酶相比，具有延伸活性高、种类多、重复性好、价格便宜等优点，但无 3′→5′ 外切核酸酶活性，不具校正功能，因此 PCR 产物中存在突变碱基(图 11-8)，而且延伸过程被终止的现象也经常发生。由于存在这些缺点，有效扩增长度在 1 kb 以下，其中 500 bp 左右的 DNA 扩增较稳定。

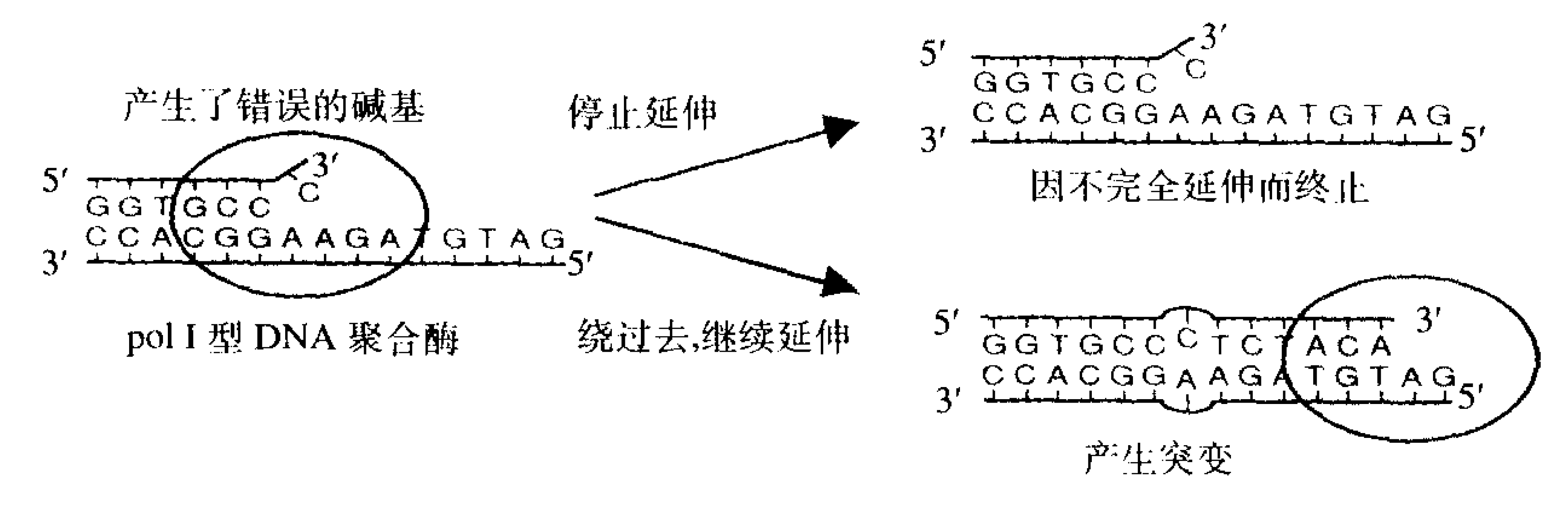


图 11-8　由 pol I 型 DNA 聚合酶产生的突变

同属于 pol I 型的 *Tth* DNA 聚合酶，在特定条件下有逆转录酶活性。因此用该酶即可完成“一步 RT-PCR”实验。

此外，TA 克隆中使用的酶也属于 pol I 型酶。表 11-1 列举了常见 pol I 型耐热 DNA 聚合酶的来源及特性。

表 11-1　常见 pol I 型耐热 DNA 聚合酶

DNA 聚合酶	来源	特性
Taq DNA 聚合酶	*Thermus aquaticus*	最常用的耐热聚合酶，有多种基因改造品种
Tth DNA 聚合酶	*Thermus thermophilus*	在 Mn^{2+}存在下，能以 RNA 为模板进行逆转录
Tfl DNA 聚合酶	*Thermus flavus*	比 *Taq* 耐热
Tbr DNA 聚合酶	*Thermus brockiamus*	比 *Taq* 保真度高，耐热性好

2. α 型 DNA 聚合酶

与 pol I 型聚合酶比较，α 型 DNA 聚合酶的最大特点是有 3′→5′ 外切核酸酶活性，因此保真性高(图 11-9)，可用于保真要求较高的扩增。此外，热稳定性也比 pol I 型酶高，95℃下半衰期达数小时至十几小时(pol I 型酶为数十分钟至 1 h)。正由于其具有 3′→5′ 外切核酸酶活性，延伸能力有所影响，而且不具有末端无模板添加碱基的活性，因而不能用于 TA 克隆实验。表 11-2 列举了常见 α 型耐热 DNA 聚合酶的来源及特性。

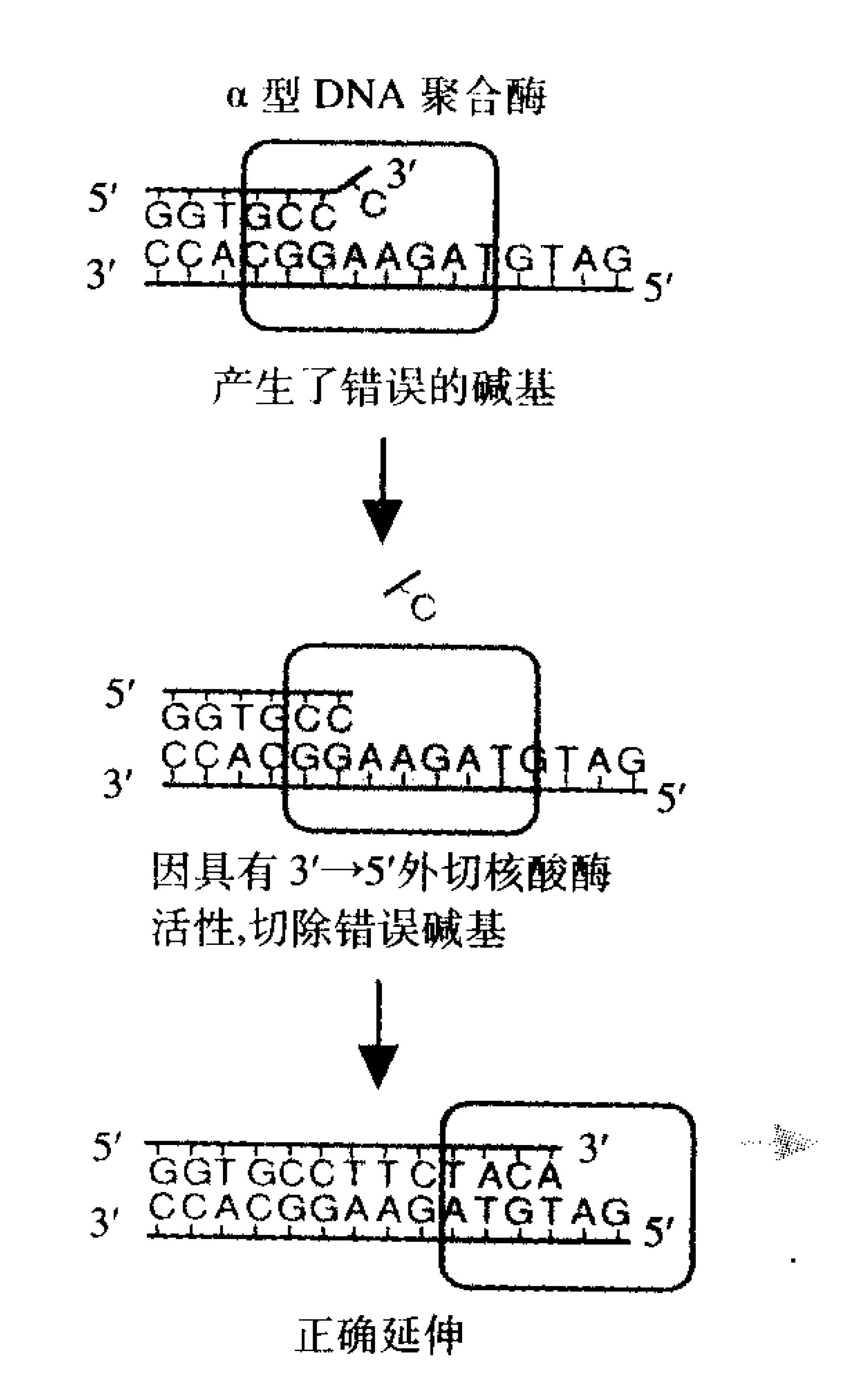


图 11-9　α 型 DNA 聚合酶的外切活性

3. 混合型 DNA 聚合酶

为弥补 pol I 型 DNA 聚合酶与 α 型 DNA 聚合酶各自的不足，常将二者按一定比例混合而成混合型 DNA 聚合酶。它既有较高的延伸能力，又有较高的保真性，pol I 型酶产生的错误碱基由 α 型外切核酸酶活性校正(图 11-10)。该混合型 DNA 聚合酶广泛用于长片段的扩增，可以扩增 5 kb 以上的 DNA 双链，但多数不能用于 TA 克隆实验。表 11-3 列举了常见混合型耐热 DNA 聚合酶特性。

表 11-2　常见 α 型 DNA 聚合酶

DNA 聚合酶	来源	特性
Pfu DNA 聚合酶	*Pyrococcus furiosus*	典型的 α 型酶
Pfu Turbo DNA 聚合酶	*Pyrococcus furiosus*	在 *Pfu* DNA 聚合酶中添加来源于 *Pyrococcus* 的 PCR 促进因子
KOD DNA 聚合酶(*Pfx* DNA 聚合酶)	*Pyrococcus kodakaraensis* KOD1	具有热启动特性
Pwo DNA 聚合酶	*Pyrococcus woesei*	5′→3′ 外切核酸酶活性完全丧失
Tli DNA 聚合酶	*Thermococcus litoralis*	3′→5′ 外切核酸酶活性完全丧失
DeepVent® DNA 聚合酶	*Pyrococcus* sp. GB-D	3′→5′ 外切核酸酶活性完全丧失，极耐热
Pyrobest™ DNA 聚合酶	*Pyrococcus* sp.	具有与 pol I 型 *Taq* 酶相同的延伸能力

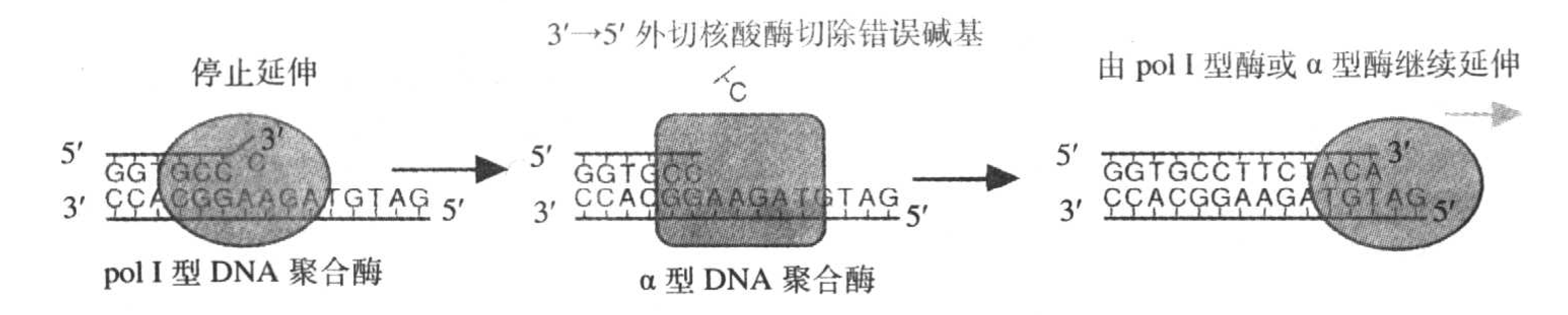
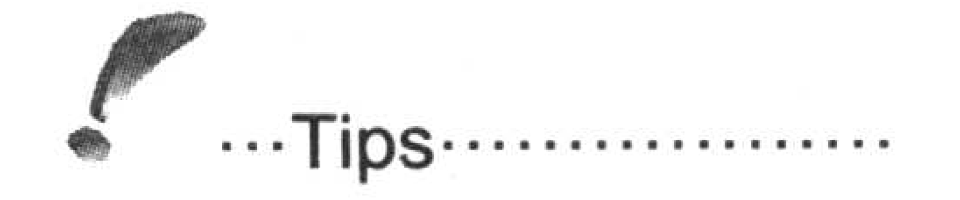


图 11-10　混合型 DNA 聚合酶产生的延伸

表 11-3　常见混合型 DNA 聚合酶

DNA 聚合酶	特性
Accu*Taq*™ LA DNA 聚合酶	*Taq* 与 α 型的混合物，基因组扩增可达 22 kb，单一片段的扩增可达 40 kb
Advantage™ 2	用于 G · C 含量高模板的扩增
Expand™ PCR System	根据用途可分为 3 类：高保真系统、长扩增系统、20 kb 以上系统
Herculase Enhanced 聚合酶	*Pfu* 与 *Taq* 混合而成
Klen*Taq*™ LA DNA 聚合酶	切除 *Taq* 外切核酸酶活性的 Klen *Taq*-1™ 与 α 型 DNA 聚合酶的混合物
Kod Dash®	野生型 KOD 酶与切除 3′→5′ 外切核酸酶活性的 KOD 酶的混合物
PLATINUM™	*Taq* 与 *Pyrococcus* sp GB-D 而来的聚合酶的混合物
rTth DNA 聚合酶 XL	需要特定缓冲液
TaKaRa LA *Taq*™	扩增可达 15 kb 以上，G · C 含量高的模板需用特殊的缓冲液
TaKaRa EX *Taq*™	高扩增能力
TaKaRa Z-*Taq*™	延伸快
*Taq*Plus™ PCR 系统	*Pfu* 与 *Taq* 混合物，根据用途分为长距离 PCR 系统与精确 PCR 系统两类



混合型酶容易失活，不能长期保存。这可能是因为混合的一方失活后，打乱了二者的平衡。

4. 热启动 DNA 聚合酶

在 PCR 起始过程中，温度较低，引物易与模板发生非特异性结合，并在 DNA 聚合酶作用下扩增出非目的 DNA。在初始过程中的低温期间，引物与引物之间也易结合，形成引物二聚体。这些非目的 DNA 或引物二聚体是在 PCR 初始时期形成的，将严重影响以后的 PCR 反应。因此在实际应用中应尽量避免这些产物的形成。例如，采用热启动 PCR DNA 聚合酶，其作用方式大致有 3 类(图 11-11)。

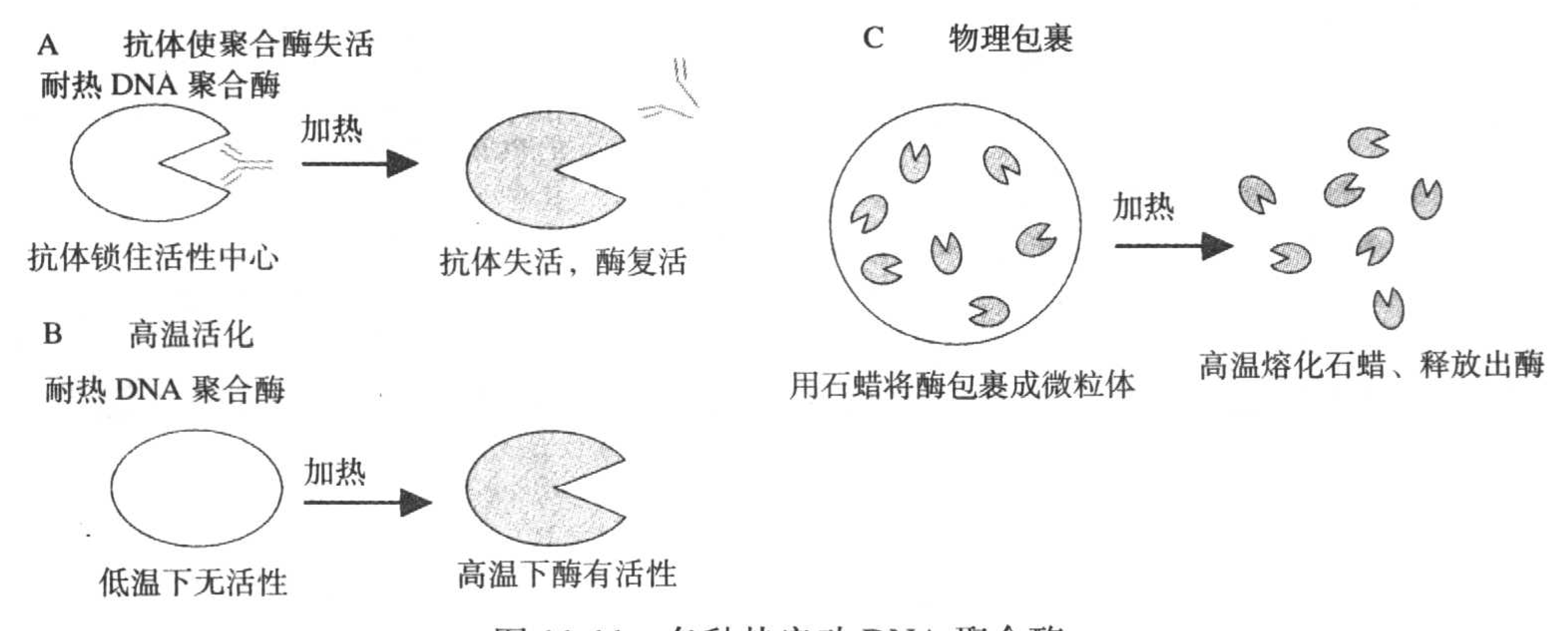


图 11-11　各种热启动 DNA 聚合酶

1) 利用抗体使酶暂时失活

多数市售热启动 DNA 聚合酶属于这类。AdvanTaq™ DNA 聚合酶(Clontech 公司)、AdvanTaq Plus™ DNA 聚合酶(Clontech 公司)、Advantage™ 2 PCR 酶系统(Clontech 公司)[a]、HotStarTaq™ DNA 聚合酶(QIANGEN 公司)、Jumpstart™ Taq DNA 聚合酶(SIGMA 公司)、KOD Plus (TOYOBO 公司)[b]、PLATINUM™ Taq DNA 聚合酶(GIBCO BRL 公司)、PLATINUM™ Taq DNA 高保真聚合酶(GIBCO BRL 公司)[a]、PLATINUM™ Pfx DNA 聚合酶(GIBCO BRL 公司)[b]。

a. 混合型酶。
b. α型混合酶。

2) 高温活化酶

AmpliTaq Gold (Applied Biosystems 公司)是利用基因工程方法对 Taq DNA 聚合酶进行改造而成的。

3) 物理包裹体

用石蜡将 Taq Bead™ 热启动聚合酶(Promega 公司)包裹成微粒体，微粒体在 60℃以上温度下被熔化，释放出聚合酶，启动 PCR 反应。

第四节 PCR 仪

根据设计的不同 PCR 仪有不同类型，因此 PCR 仪的选择是 DNA 扩增中的一个非常需要考虑的因素。

1. 温度控制模式的不同

1) 模块温控式

这是大多数研究者使用的机型。通过对金属模块温度的调控，进而控制插于金属模块 PCR 管的温度。

2) 毛细管式

将少量反应液加于毛细管内。由于毛细管极小，可快速调控其温度，因此，几十分钟就可完成 30 个以上的反应循环。但这种机型尚不普及，也不能用于热启动 PCR。

3) 机械臂式

目前该类型产品不多。利用机械臂将反应管移动到不同温度的油浴中而调控反应管温度。它比模块温控式易实现温度调控，但温度升降较慢。

2. 是否加入液体石蜡

加热时，反应液中的水分被蒸发并凝结到盖上，反应体积缩小(甚至完全变干)，因而反应液各组分浓度被改变，而导致 PCR 失败。为防止这种蒸发，一般在反应液表面加

一层比水轻的液体石蜡(图 11-12A)。

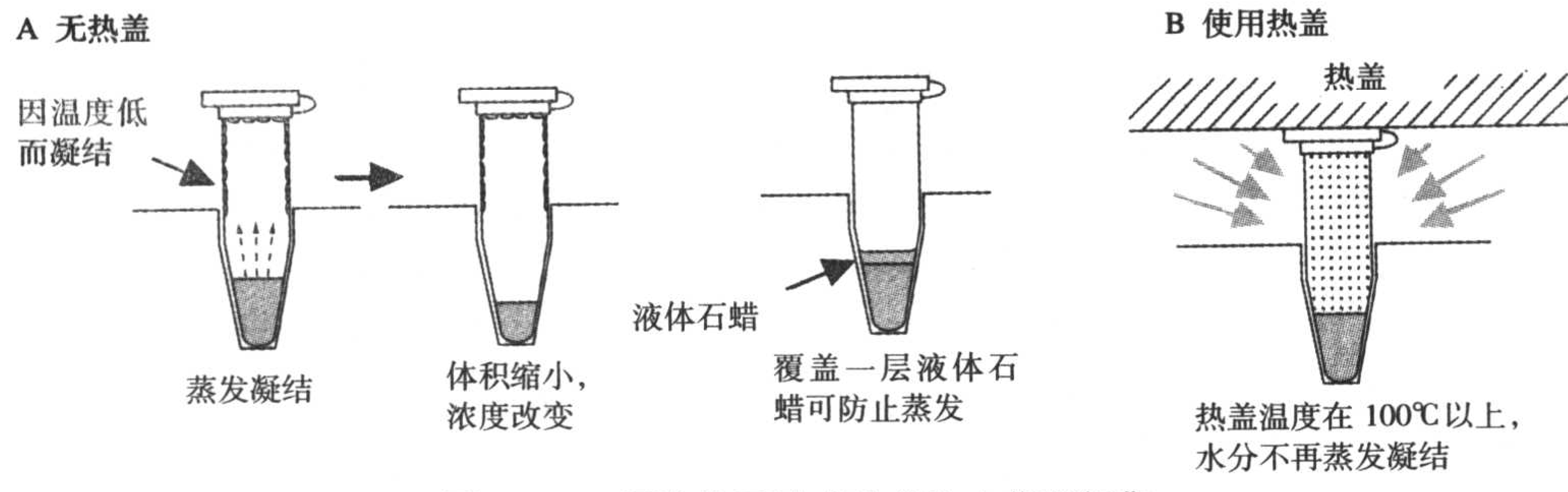


图 11-12　用液体石蜡或热盖防止蒸发凝集

现在开发的机型多安装了热盖，解决了因水分蒸发而使反应体积缩小的问题，因而一般不再需要添加液体石蜡来密封反应体系。

3. 使用不同的 PCR 管

模块温控式 PCR 仪可更换不同模块，因而可选择不同大小的 PCR 管。以前多使用 0.5 mL 管，现在多使用 0.2 mL 薄壁管或 0.5 mL PCR 专用管。使用厚壁管，温度升降需要较长时间；而使用薄壁管，温度升降较快。

4. 模块冷却模式的不同

模块冷却模式大致包括两类：热电制冷及压缩制冷。热电式易使 PCR 仪实现小型化、轻量化，但半导体寿命短，每隔几年就需要更换。压缩式 PCR 仪耐用，但体积大、有噪音。

第五节　PCR 基本操作

1. 反应体系

利用 *Taq* DNA 聚合酶的标准反应体系包括以下成分：

1) 10×添加缓冲液

成分包括：

Tris · HCl (pH8.4~9.0)：10~25 mmol/L

KCl：50 mmol/L

$MgCl_2$：1.5 mmol/L (1.0~5.0 mmol/L)，不同扩增模板或引物，其浓度有所差异，因此商家提供的缓冲液中一般不含 $MgCl_2$,另单独提供一管 25 mmol/L $MgCl_2$ 溶液，供研究者根据需要添加

白明胶或 Triton X-100：0.01%

上述试剂是标准 10×缓冲液中的组分，对于 G · C 含量高的模板的扩增，缓冲液中还应加入 DMSO 或其他特殊成分。

2) 其他成分

dNTP：0.2 mmol/L

引物：0.5 μmol/L (0.2~1.0 μmol/L 范围内)，浓度过高易产生非特异性扩增

模板：加入的浓度与模板种类、纯度、扩增目的等有关。质粒 DNA 每微升常用数十皮克，基因组 DNA 每微升常用数十纳克

耐热 DNA 聚合酶：2.5×10^{-2} U/μL。过多的酶易产生非特异性扩增

液体石蜡：视需要与否加入

2. 循环参数设置

根据实验情况，设置循环参数。

1) 引物退火温度

主要根据引物 T_m 值及引物间 T_m 值差来确定。通常设定为较低引物 T_m 值附近的温度为退火温度[a]。若出现非特异性扩增，可增加 2~3℃；若无扩增条带，可降低 2~3℃。

a.实际退火温度比 T_m 值高 5°C，有时也能扩增出特异带。

2) 各步反应时间

各步反应时间的设置，应考虑 PCR 仪机型、反应管种类等因素。使用薄壁管时可选择以下参数：

A) 热变性(93~95℃)：30 s

时间过短，可能导致变性不充分，但时间过长，易使酶失活(特别是 pol I 型酶)。*Taq* DNA 聚合酶在 95℃下的半衰期为 10 min~1 h。

B) 退火(T_m 值附近温度)：30 s

适当延长退火时间对扩增没有影响。

C) 延伸(68~72℃)：(0.5~1 min)×待扩增片段长度(kb)

即使是 LA-PCR(long and accurate PCR，长距离精确 PCR)，该时间也足够了。

3) 循环数

循环数的设定取决于模板量。扩增基因组 DNA 或进行 RT-PCR，30~35 个循环就足够了。若 PCR 后条带仍很弱，应选用巢式 PCR。

为减少变异，循环数应尽可能少。循环数增多，错误率就会提高。因此，模板量多的 PCR 扩增，循环数最好控制在 20~25 次。

4) 典型 PCR 循环参数

图 11-13 为 0.2 mL 薄壁管的典型 PCR 循环参数。若用厚壁管，各步时间应适当延长。

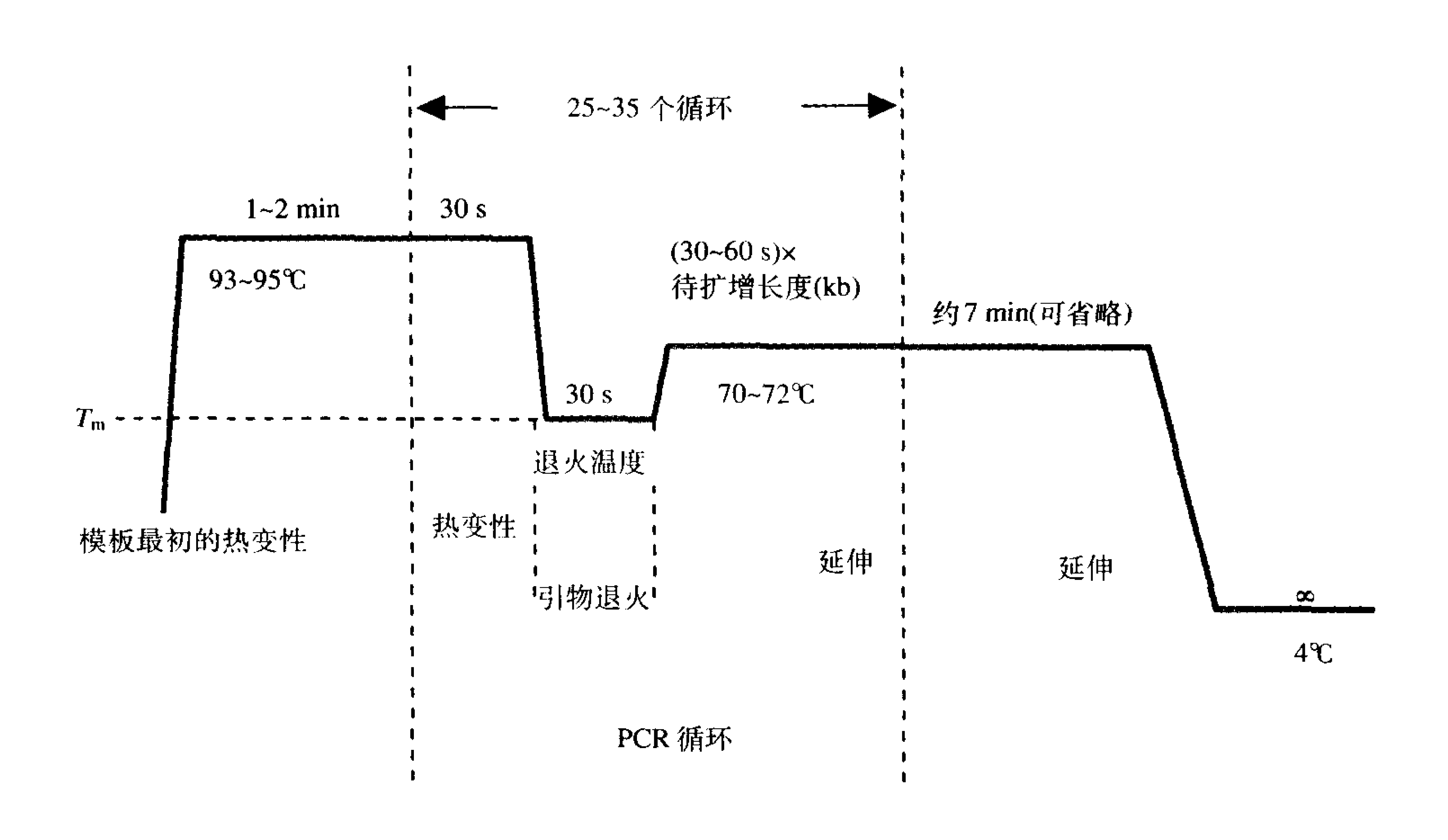


图 11-13　典型的 PCR 循环

5) 循环修饰 [b]

有各种各样的方式改变循环设置，主要有以下三种。

b. 介绍的各步时间参数是针对于 0.2 mL 薄壁管的。若使用厚壁管应延长反应时间。

A) Shuttle PCR(二温 PCR)

引物 T_m 值足够高(65℃以上)时，可将退火与延伸温度设定成同一个值，因而退火与延伸合二为一。其优点是减少非特异性扩增，缩短时间。温度为：93~95℃热变性，68~72℃退火/延伸(图 11-14A)。

B) Step-up PCR(梯度升温 PCR)

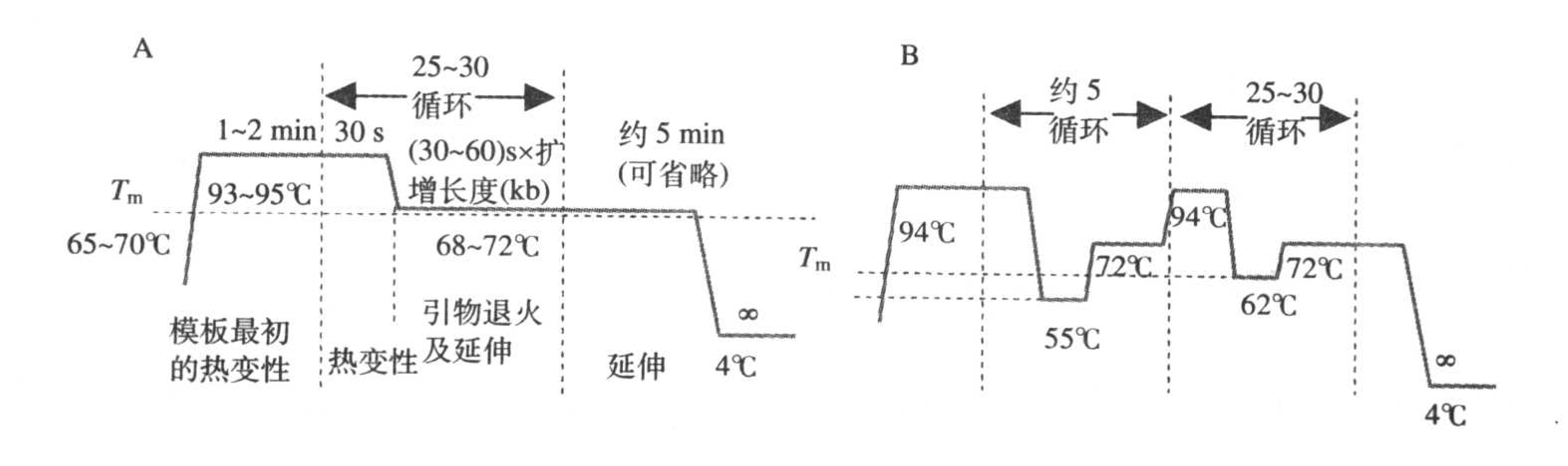
用于 5′ 端添加酶切位点碱基的引物扩增。最初循环中，退火温度根据除酶切位点外的配对区段的 T_m 来设定。随着扩增产物添加 5′ 酶切位点，可配对区段变长，这时可根据引物全长 T_m 值设定退火温度。该方法的优点是增加特异扩增。例如，敲除酶切位点外后的引物 T_m 值为 55℃，全长引物 T_m 为 65℃，可用图 11-14B 方式扩增。

C) Touch-down PCR(梯度降温 PCR)

在以基因组 DNA 为模板进行扩增(或 RT-PCR)中，非特异性扩增较多，这时，最初退火温度选用比 T_m 值高 5~10℃的温度 [c]。然后每隔 1 个循环，退火温度降低 1~2℃ [d]，直至正常 T_m 值附近的退火温度。图 11-14C 是 T_m 值为 62℃时的扩增模式。

c. 同时使用热启动聚合酶，效果更佳。

d. 应根据实验确定温度降低的间隔。



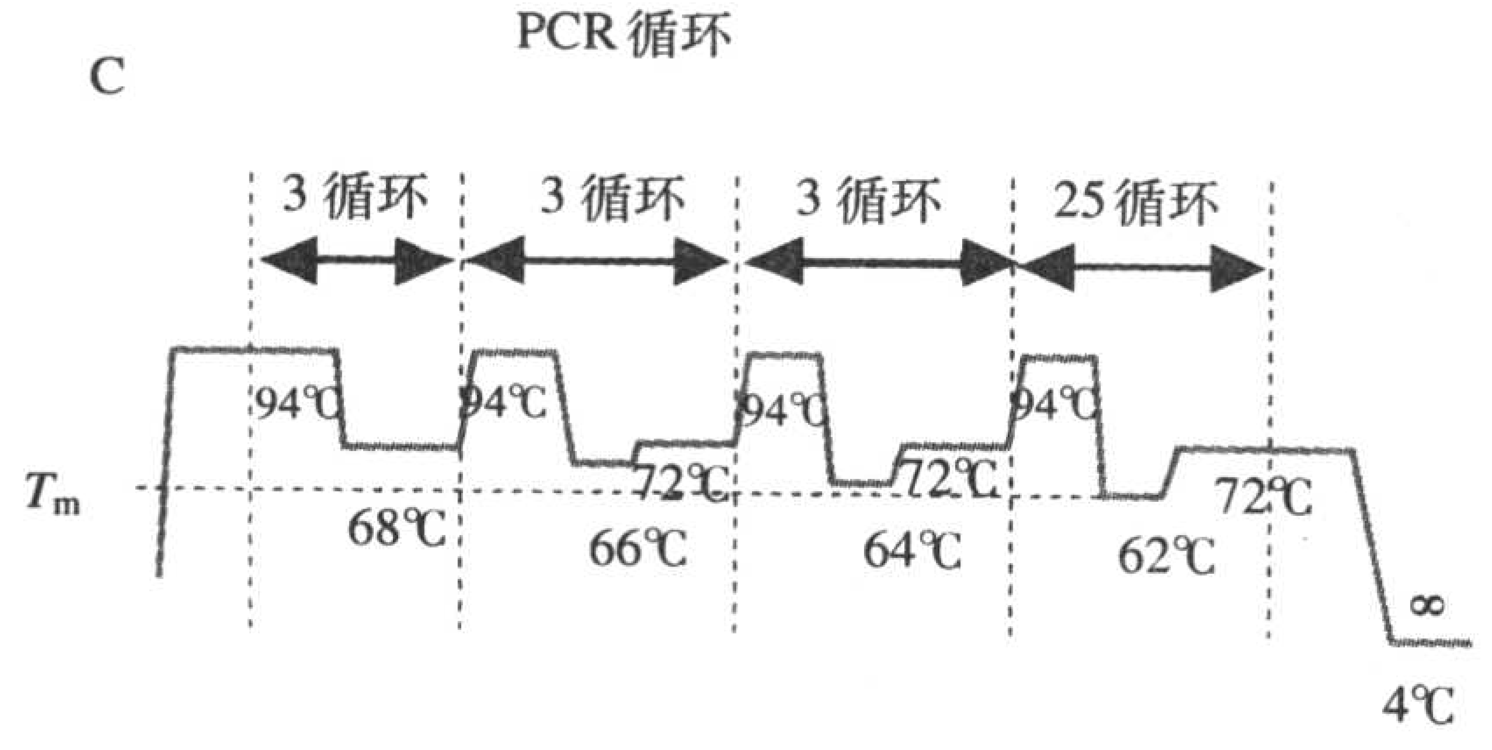


图 11-14　循环参数修改的 PCR

A. Shuttle PCR; B. Step-up PCR; C. Touch-down PCR

第六节　PCR 实例

Materials

(1) PCR 仪(MJ Research PTC-200)
(2) 0.2 mL 薄壁管
(3) r*Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL)
(4) 10×添加缓冲液(+15 mmol/L $MgCl_2$)
(5) 模板 DNA(0.1~0.5 ng/μL)
(6) 2.5 mmol/L dNTP
(7) 引物 2 种(各 10 μmol/L)
(8) PCR 专用灭菌水

Protocols　　Time: 配制试剂 5 min　PCR 反应 2.5 h　电泳 30 min

ⓐ 冰上配制以下试剂至 0.2 mL 薄壁管中[a]。

10×添加缓冲液	2.5 μL
2.5 mmol/L dNTP	2.0 μL
引物 A	1.25 μL[b]
引物 B	1.25 μL[b]
DNA 模板	0.5 μL[b]
r*Taq*(5 U/μL)	0.125 μL

用 PCR 专用无菌水定容至 25 μL

↓

ⓑ 在 PCR 仪上输入以下参数：

94℃	5 min	
94℃	30 s	25 个循环
55℃	30 s	
72℃	1 min	

a. 若配置多个 PCR 反应管，可将共同试剂配成混合物后再分装，这样可提高效率。

b. 模板、引物量与样品有关。25 μL 体系的模板量为：

质粒 DNA	50 pg~5 ng
人基因组 DNA	50~500 ng
E. coli 基因组 DNA	5~50 ng
λ DNA	250 pg~2.5 ng


72℃　　7 min

4℃　　∞

↓

ⓒ 先不将 PCR 管插入模块，启动反应程序。

↓

ⓓ 待温度升至 94℃，按“Pause”键，暂停反应程序，迅速将 PCR 管插入模块，盖上盖子，再启动反应程序。

↓

ⓔ 程序完成后，取 1~2 μL 用于电泳检测。

第七节　预 防 污 染

PCR 是特异性地扩增目的 DNA 的方法，但同时其灵敏度也极高，反应体系中混入极微量污染物都可能导致实验出现错误。

1. 试剂

所有试剂应保证其纯度。

(1) 水：双蒸水灭菌后分成小管，单独保存于冰箱中，作为 PCR 专用水。

(2) 引物：用 PCR 专用水或专用水配制的 TE 作溶剂溶解干品或稀释母液。

(3) 模板 DNA：模板 DNA 必须经酚/氯仿抽提、乙醇沉淀等操作，使之纯化。

2. 微量移液器

使用微量移液器吸取溶液时，操作过于猛烈，枪尖内形成较强负压，溶液产生雾化并进入微量移液器的吸杆内，这将成为下次取液时的污染源(图 11-15)。因此养成缓慢取液的良好习惯，是保障实验成功的关键。现在市场上销售的塞有过滤膜的枪尖，可以解决这一污染问题，但价格较贵。

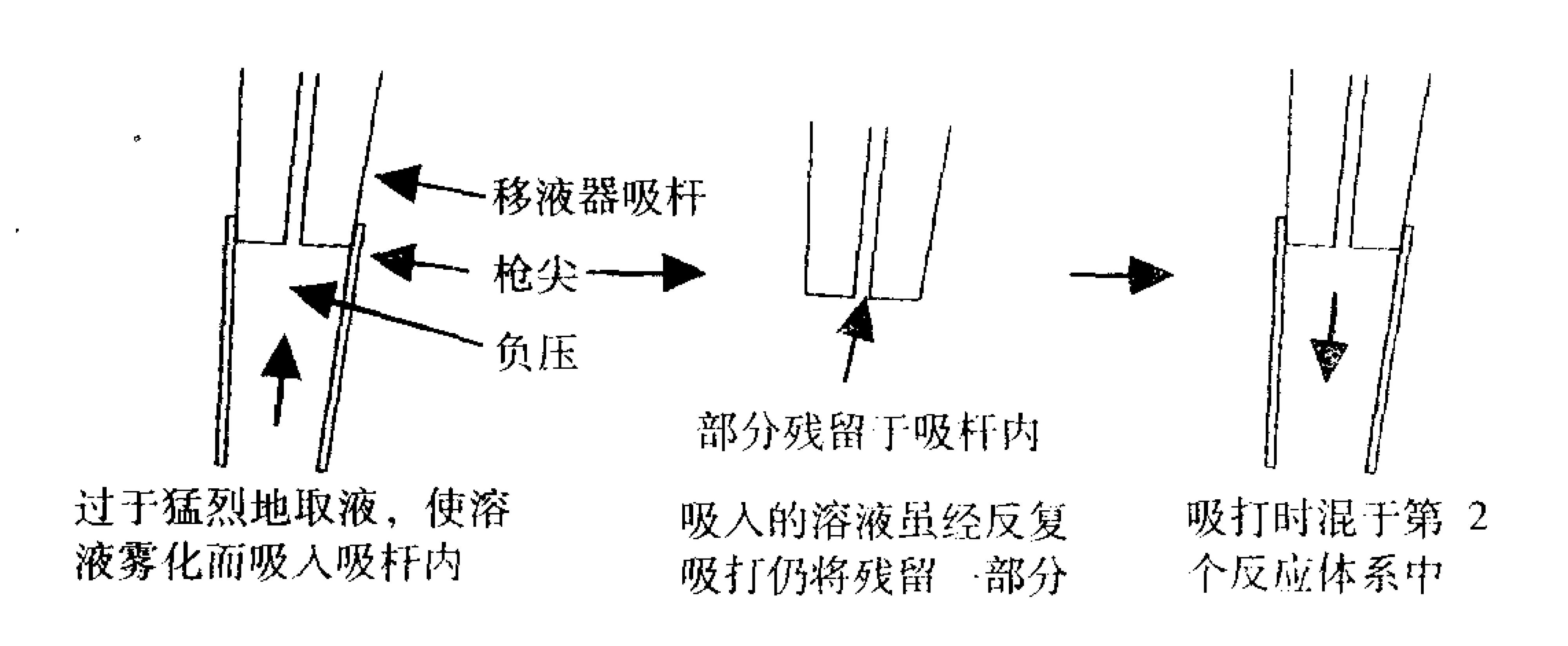


图 11-15　由微量移液器导致的污染

3. 负对照

设置阴性对照是判定实验是否被污染的主要方法，也是确定污染原因的重要方法。



不仅仅是 PCR 实验，所有分子生物学实验均应同时设正对照和负对照。这不仅仅是为了写论文，更是为了评价所得实验结果，分析可能发生的问题(已知的或未知的)及各种因素对实验结果的影响，这样将大大提高实验效率。因此应养成设置对照的好习惯。

第八节 热 启 动

PCR 起始时的温度较低，引物与模板或与另一引物之间易发生非特异性结合(错误配对)。这种非特异性结合在 DNA 聚合酶的作用下产生扩增反应，因而产生出包括引物二聚体、错误扩增片段在内的产物(图 11-16)，这些产物将严重影响以后的扩增。

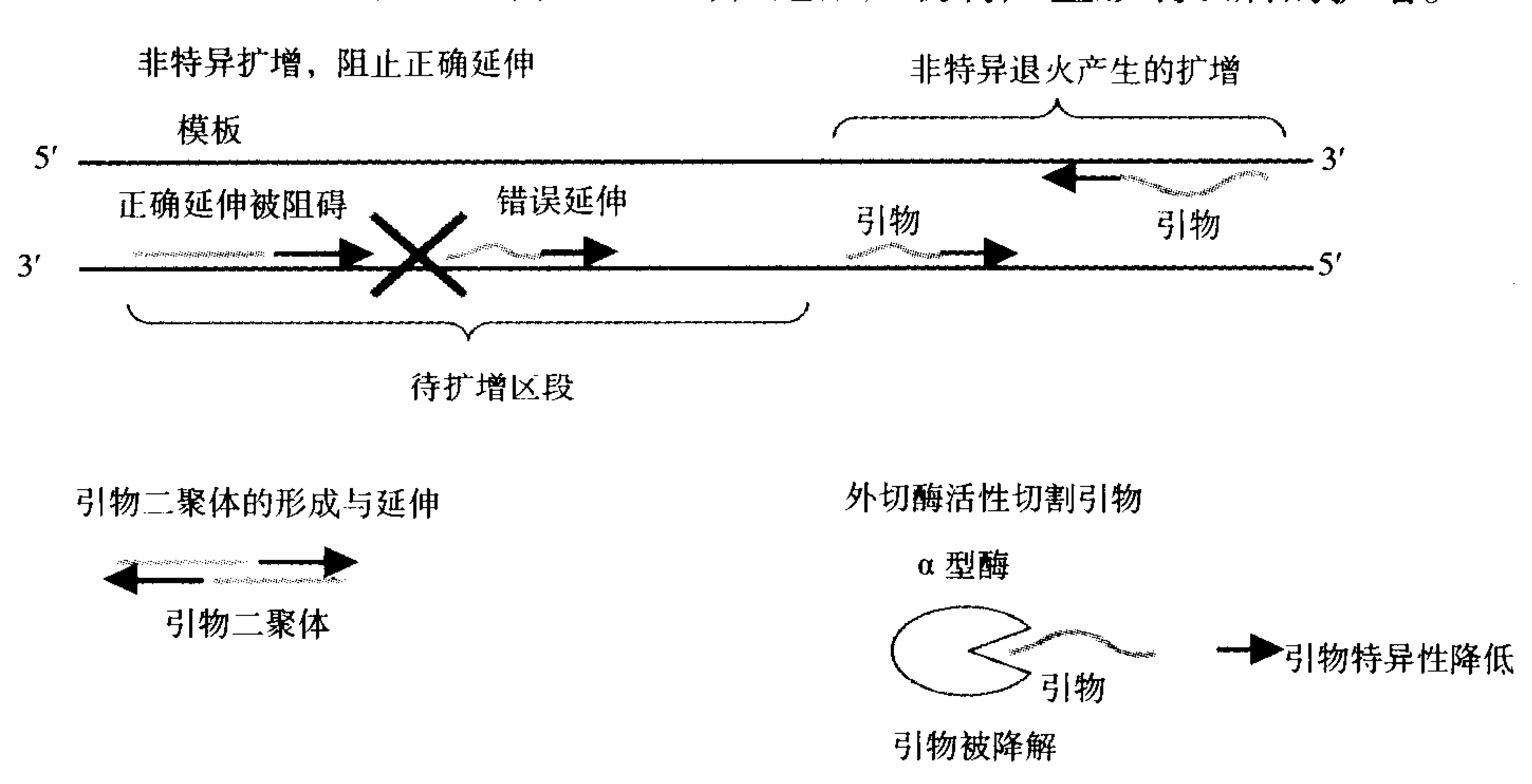


图 11-16 由低温启动所产生的问题

有些 DNA 聚合酶(如 α 型酶)具有 3′→5′ 外切核酸酶活性，在升温过程中，外切核酸酶活性可能发挥作用，切割引物，使引物长度缩短，降低特异性。

上述问题是 PCR 实验中必须克服的。为此，需用高温启动 PCR 反应，以省去低温过程，这种方法叫热启动(hot start)。进行热启动的最简单方法是在高温下添加各种反应成分，但这种操作较困难。下面介绍 3 种有效的热启动方法。

1. *后添加反应液方式*

PCR 反应体系中的某一成分先不加入到反应管中，待温度升至预变性温度时，再加入到反应管中使反应启动。究竟哪种成分适合于后加入呢？虽然每一成分均可按后添加方式加入，但 dNTP 是最合适的，因为一般体系中 dNTP 体积较大，dNTP 又是反应必需的。

Materials

(1) PCR 仪(MJ Research PTC-200)

(2) PCR 反应液(除 dNTP)

(3) dNTP

Protocols　　Time：20 min

ⓐ 除 dNTP 外，冰上配制反应液。

↓

ⓑ 加一层液体石蜡[a]。

↓

ⓒ 置于 PCR 仪中，启动反应程序。

↓

ⓓ 温度升至预变性温度时，暂停反应程序。

↓

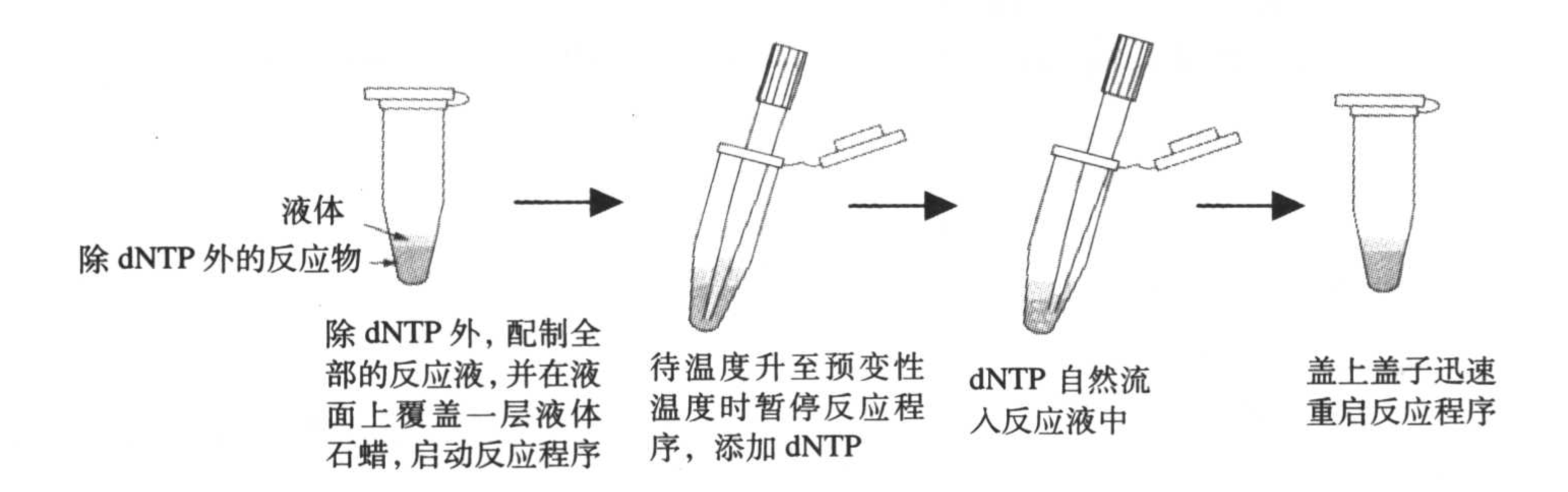
ⓔ 分别在每管中添加 dNTP 溶液[b]。

↓

ⓕ 所有样品中添加完 dNTP 后，又重新启动反应程序。

a. 为防止打开热盖过程中的水分蒸发，即使是有热盖的 PCR 仪，也应添加液体石蜡。

b. 高温使得枪尖内的空气膨胀，即使不推，液体也能流出。



2. 石蜡隔离方式

后添加反应液方式比较费时，若样品多，或不能开盖，就不能使用后添加反应液方式，可采用物理方法将反应液隔离起来。

Materials

(1) PCR 相关设备和试剂

(2) 固体石蜡(熔点在 58~62℃)等

Protocols　　Time：25 min

ⓐ 分别配制等体积反应液 A(模板、引物、1×缓冲液)和反应液 B(酶、1×缓冲液、dNTP、$MgCl_2$)。

↓

ⓑ 将 A 液加入到 PCR 管中，并加石蜡。

↓

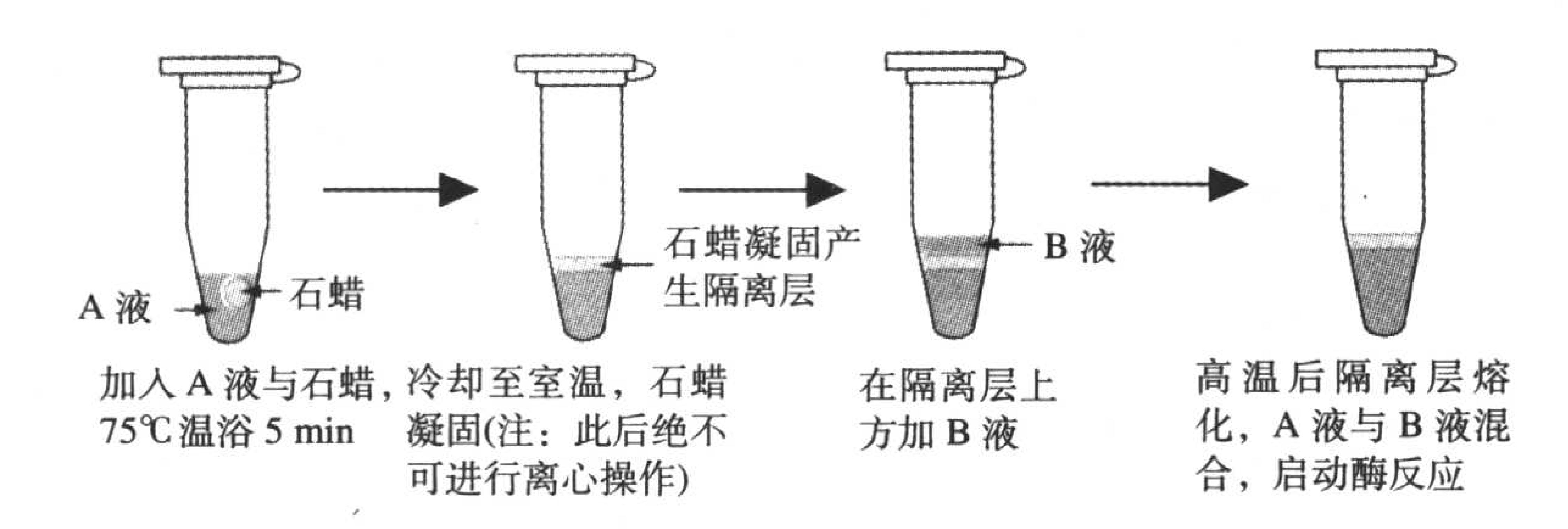
ⓒ 75℃温浴 5 min，待石蜡熔化后室温下静置 15 min，以使石蜡凝固。

↓

ⓓ 打开 PCR 管盖，将 B 液置于石蜡上层。

↓

ⓔ 将 PCR 管置于 PCR 仪中，启动反应。



3. 使用热启动 DNA 聚合酶

这是一种最省事的方式，但应考虑经济情况。

Tips

PCR 常见问题及解决途径

问题	原因		解决办法
假阴性 (不出现扩增条带)	引物	质量问题	重新设计，或选择一好的公司重新合成
		反复冻融或长期存放于冰箱冷藏箱，导致降解	重新合成
		浓度过高或过低，两引物浓度相差过多	调整浓度
		退火温度过高	降低退火温度
	模板	含有杂蛋白，特别是染色体组蛋白	重提模板
		含 *Taq* 酶抑制剂	
		提取过程中损失过多	
		含酚或 SDS 等抑制剂	
		反复冻融或长期存放于冰箱冷藏箱，导致降解	
		变性不彻底	调整变性温度
		浓度过高或过低	调整模板浓度
		变异	更换模板材料
	Taq 酶	失活	更换新酶
		未加	补加酶
		浓度过高或过低	调整浓度
	染色	EB 浓度太低或失效	提高 EB 浓度或更换新的 EB
		未加 EB	补加 EB
	电泳	检测时间	48 h 以内完成，最好于当日完成电泳检测
	dNTP	浓度太低或失效	调整浓度
	Mg^{2+}		
	程序	反应程序问题	重新设计反应程序
		循环数过少	增加循环数
假阳性 (出现了不需要的目的带)	引物	浓度过高	调整浓度
		与非目的扩增序列有同源性	重新设计引物
		太短	
	靶序列	太短	

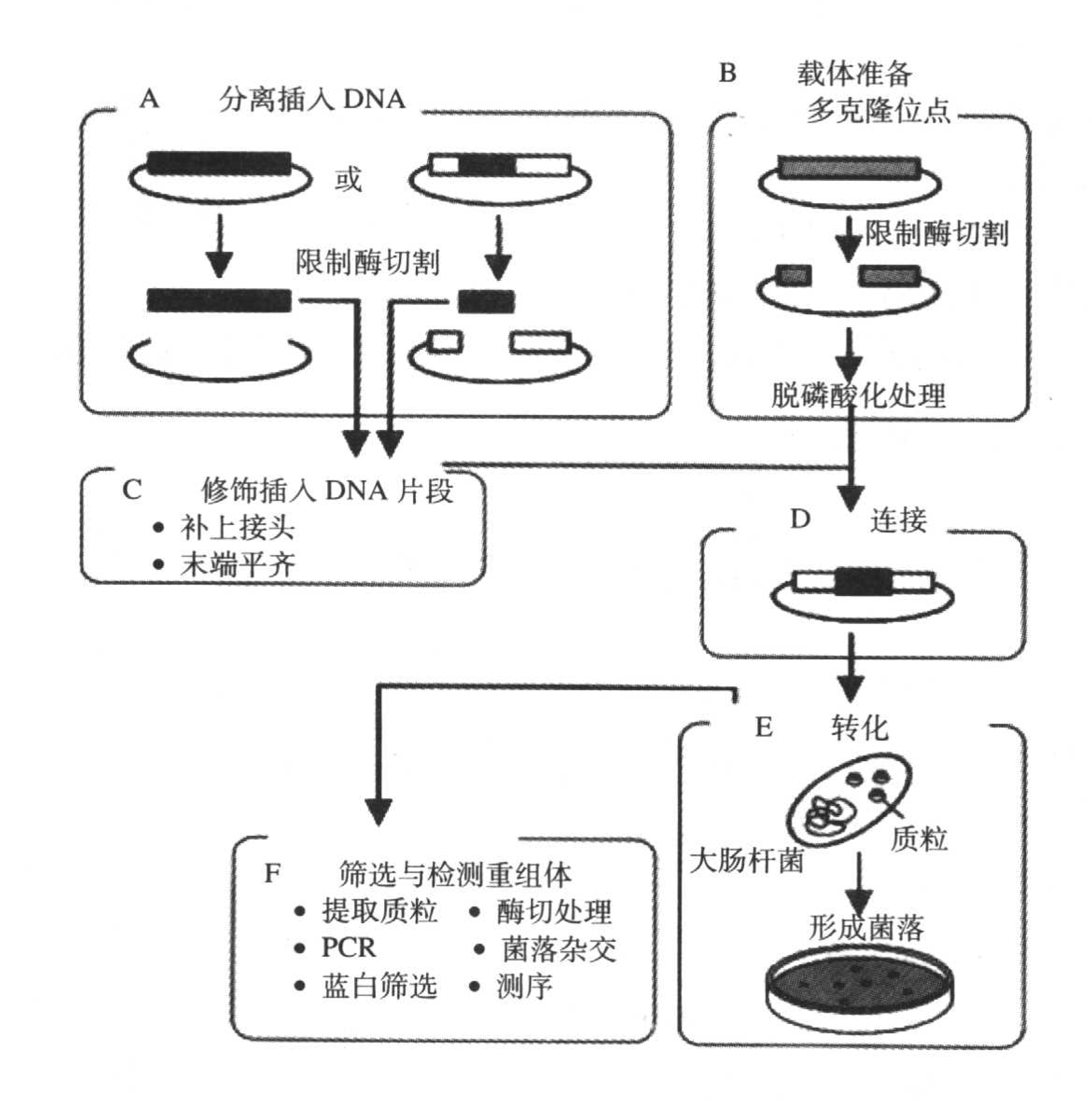
续表

问题	原因		解决办法
假阳性 (出现了不需要的目的带)	污染	操作	谨慎操作、试剂及反应管灭菌或用巢式 PCR 扩增方式
	模板	浓度过高	调整浓度
	Taq 酶		
	dNTP		
	Mg^{2+}		
	程序	反应程序问题	重新设计反应程序
		循环数过多	减少循环数
假阳性 (出现了非特异性扩增带)	靶序列	太短	重新设计引物
	引物	二聚体	
		太短	
		与非目的扩增序列有同源性	
		浓度过高	调整浓度
	污染	操作	谨慎操作、试剂及反应管消毒或用巢式 PCR 扩增方式
	模板	浓度过高	调整浓度
	dNTP		
	Mg^{2+}		
	Taq 酶	浓度过高	
		质量	更换质量好的酶
	程序	反应程序问题	重新设计反应程序
		循环数过多	减少循环数
出现片状拖带或涂抹带	*Taq* 酶	质量	更换质量好的酶
		浓度过高	调整浓度
	dNTP		
	Mg^{2+}		
	模板	浓度过低	
	程序	反应程序问题	重新设计反应程序
		循环数过多	减少循环数

…Questions………………

1. 简述 PCR 的基本原理。
2. 如何减少 PCR 的操作污染？操作中应注意哪些问题？
3. 如何设计理想的 PCR 引物？应考虑哪些因素？什么叫保护碱基？引物设计时，如何利用保护碱基？
4. 在 PCR 反应组成和操作上，如何尽量避免产生引物配对？
5. 在 PCR 操作中有几类常用的耐热 DNA 聚合酶？如何选购理想的耐热 DNA 聚合酶？为什么？
6. 如何避免 PCR 出现假阳性和假阴性？降低退火温度对 PCR 结果有何影响？延长变性时间对 PCR 结果有何影响？循环次数是否越多越好？为什么？

第十二章 DNA 重组



第一节 重组流程

所谓DNA 重组是指将目的 DNA 从这一载体插入到另一载体的过程。在基因分离过程中，一般先将分离的 DNA 片段克隆到不能表达的克隆载体，测序确认后再重组到能表达的载体；或者从一个表达不合适的载体重组到另一表达合适的载体，包括以下几个过程：

(1) 从原来载体中分离出特定 DNA，即“插入 DNA”；

(2) 根据实验目的选择合适载体；

(3) 对插入 DNA 与载体分别进行酶切或脱磷酸化处理；

(4) 酶切完毕的 DNA 与载体连接；

(5) 连接 DNA 转入合适宿主菌，获取重组体；

(6) 筛选、检测重组体。

第二节　插入 DNA 的准备

如果是对全长 DNA 进行重组，而且有合适限制性内切核酸酶位点，可直接进行酶切处理(图 12-1A)。如果仅克隆部分 DNA 片段(如结构域分析、缺失体分析等)，可采用以下方法：

(1) 有合适限制性内切核酸酶位点，用限制性内切核酸酶直接消化(图 12-1B-a)；

a. 两端酶切位点可以不同。用不同酶切割的片段更适合后续实验。

(2) 用 PCR 扩增(图 12-1B-b)；

(3) 用一些特殊核酸酶处理 DNA(图 12-1B-c)。

能用限制性内切核酸酶切割的，酶切完后[a]，用琼脂糖凝胶回收目的 DNA 带。

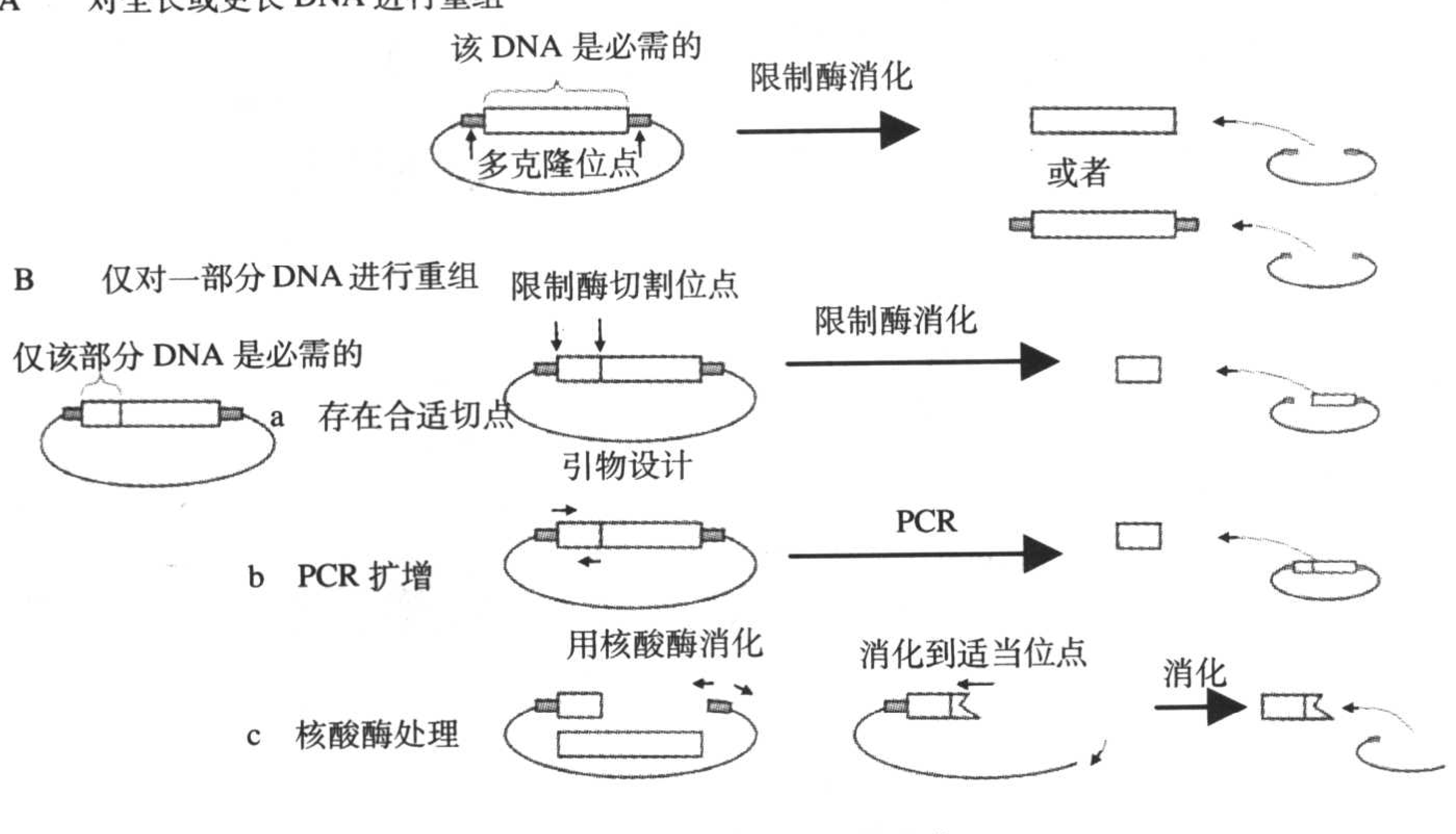
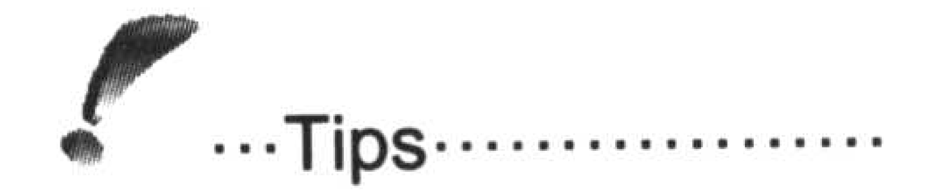


图 12-1　插入 DNA 的准备



将插入 DNA 克隆进表达载体时，必须注意可读框是否正确，否则表达的蛋白质不是你所希望的！

第三节　载体的准备

1. 末端结构

在准备插入 DNA 的同时，也要对载体进行酶切处理，这时需要注意酶切片段的末端结构及黏性末端的碱基组成。载体与插入 DNA 的连接方式有如下几种：

(1) 用同一种限制酶切割载体和插入 DNA(图 12-2A)→二者能正确连接，但不能确定方向；

(2) 用不同限制酶切割，所得单链突起能互补(图 12-2A)→二者能正确连接，但不能确定方向；

(3) 限制酶切割所得片段为平末端(图 12-2B)→能连接，但连接效率很低，而且不能确定方向；

(4) 用不同限制酶切割载体或插入 DNA，而且两末端结构不同(图 12-2C)→能连接，也能确定连接方向。这种模式被广泛应用。

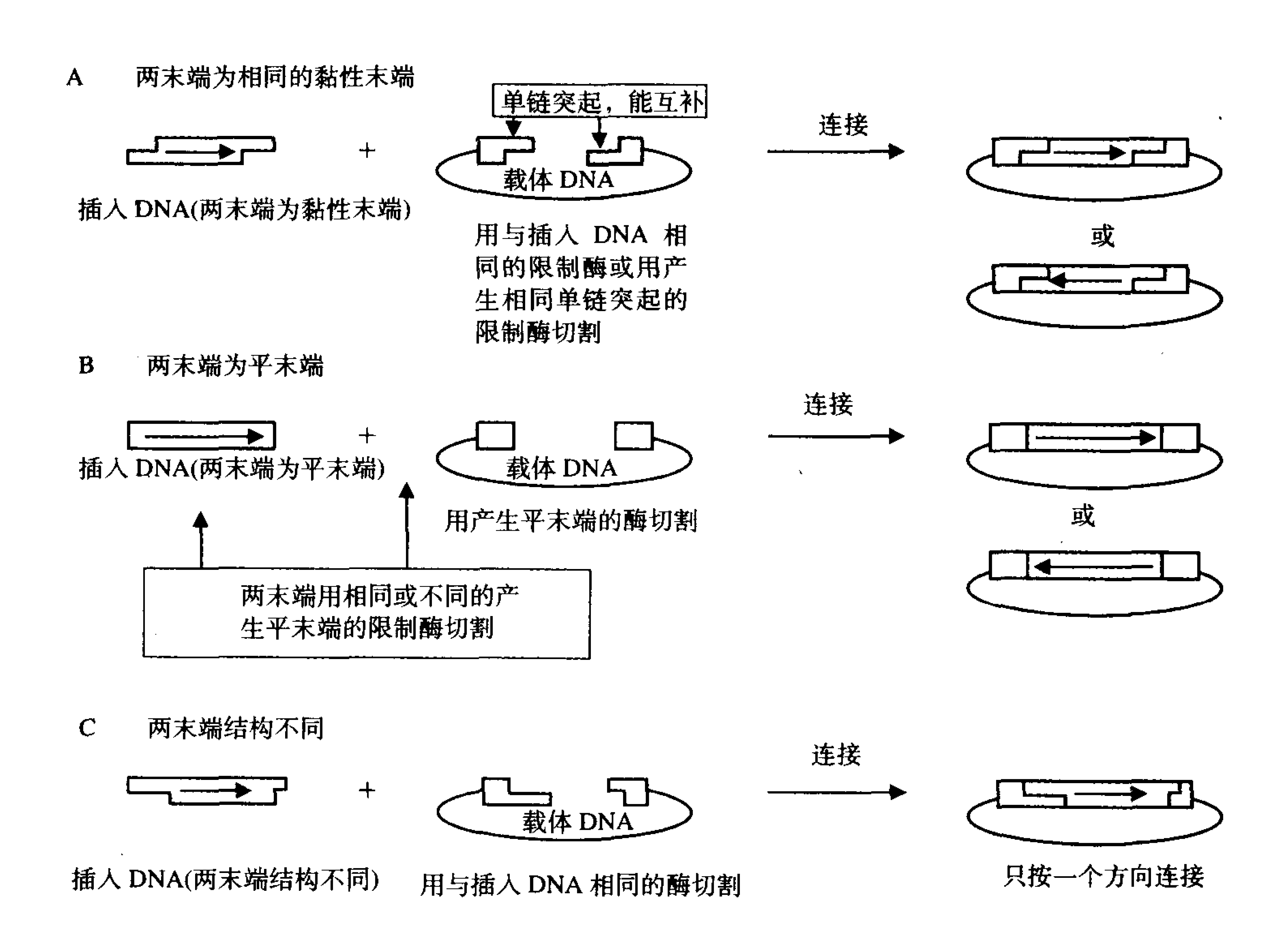


图 12-2 载体与插入 DNA 的末端结构

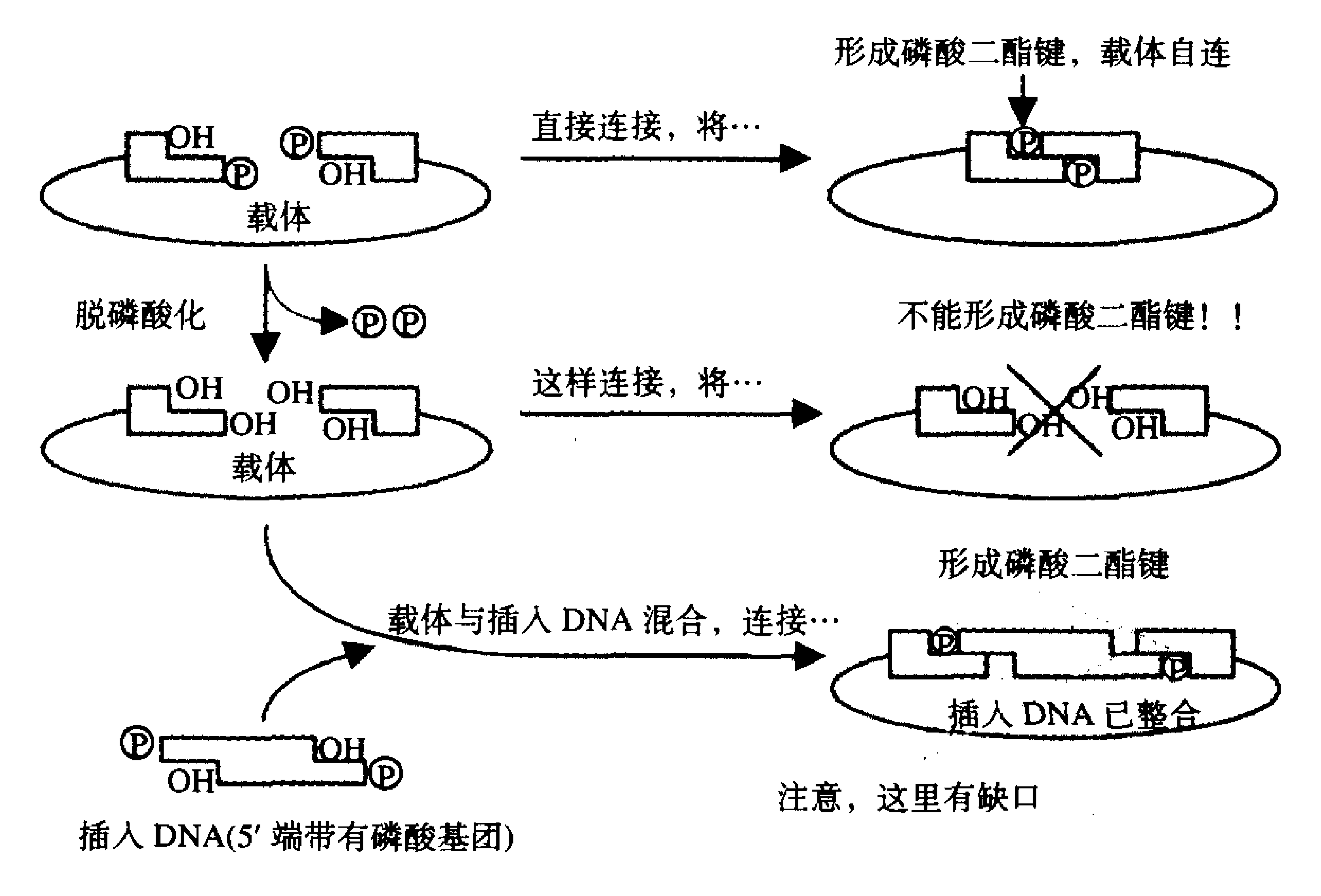


图 12-3 载体自连与脱磷酸化

2. 脱磷酸化处理

对于仅用限制性内切核酸酶消化的载体，在与插入 DNA 连接的同时，也能进行自我连接，因此有必要将载体 DNA 末端进行脱磷酸化处理，以防止载体自连(图 12-3)。当脱磷酸化的载体与插入 DNA 连接后，脱磷酸部位不能形成磷酸二酯键而产生缺口，具有这种缺口的质粒转入大肠杆菌后，将利用大肠杆菌修复酶系统完成修复。对于图 12-2C 所示的不同末端结构的载体和 DNA 连接，可以不进行脱磷酸化处理。

3. 载体 DNA 提取实验

Materials

(1) 60~65℃恒温水浴锅(或恒温箱)
(2) 台式离心机
(3) 旋涡混合器
(4) 离心干燥机
(5) 载体 DNA
(6) 双蒸水
(7) 细菌碱性磷酸酶(BAP)
(8) 10×BAP 添加缓冲液，或 1 mol/L Tris・HCl(pH8.0)
  500 mmol/L Tris・HCl(pH9.0)
  10 mmol/L $MgCl_2$
(9) 100%乙醇(−20℃)，70%乙醇(−20℃)
(10) 3 mol/L NaAc (pH5.2) (附录一)
(11) 苯酚/氯仿/异戊醇 (附录一)

Protocols　　Time：6.5 h

ⓐ 1 μg 载体 DNA 于 20 μL 酶切反应体系中消化。

↓

ⓑ 乙醇沉淀[a]：

加 2 μL 3 mol/L NaAc，混匀，再加 50 μL 100% 预冷乙醇，再混匀。按常规的乙醇沉淀、漂洗等方法操作

↓

弃上清，离心干燥沉淀

↓

ⓒ BAP 处理(脱磷酸化)：

将ⓑ中的 DNA 沉淀溶于 17 μL 双蒸水中，并加以下试剂：

10×BAP 添加缓冲液	2 μL
BAP	1 μL(0.3~0.5 U)
总体积	20 μL

↓ O/N

60~65℃条件下温育 1 h[b]

↓

ⓓ 加 80 μL 双蒸水，进行酚/氯仿抽提。为彻底去除残留的 BAP，应反复抽提 3 次。

↓

ⓔ 乙醇沉淀：

a. 由于酶切体系中含有BAP所需的 Mg^{2+}，因此，若想加快实验进程，可将酶切溶液经 65℃热处理 10 min 后直接加 1/10~1/5 体积的 1 mol/L Tris・HCl (pH 8.0)及 BAP 进行脱磷酸化。

b. 过夜时，使用恒温箱。

加 1/10 体积 3 mol/L NaAc 后混匀，再加 2.5 倍体积 100% 预冷乙醇，再混匀

↓

按步骤ⓑ操作，进行乙醇沉淀

↓

ⓕ 溶解于适量的(5~10 μL)双蒸水中[c]。

c. 插入 DNA 很难插入到载体中时(如 DNA 过长、载体过大、平末端连接文库构建等)，不要使用未脱磷酸化的载体，最好进行多次脱磷酸化处理(再次进行酶切→BAP 处理)以减少载体自连情况的发生。

第四节　连　　接

载体与插入 DNA 准备完毕后，就可以进行连接了。

Materials

(1) DNA 快速连接试剂盒(Roche Diagnostics 公司)
   - DNA 稀释缓冲液(5×)
   - T4 DNA 连接缓冲液(2×)
   - T4 DNA 连接酶

(2) 双蒸水

(3) 脱磷酸化的载体 DNA

(4) 插入 DNA

Protocols　　Time：30 min

ⓐ 混合以下试剂：

载体 DNA	x ng [a]
插入 DNA	y ng [b]
DNA 稀释缓冲液(5×)	1 μL

用双蒸水定容到 5 μL

↓

ⓑ 混匀。

↓

ⓒ 加 5 μL T4 DNA 连接缓冲液(2×)，混匀。

↓

ⓓ 加 0.5 μL T4 DNA 连接酶，混匀[c]。

↓

ⓔ 室温静置 5 min。

↓

ⓕ 直接用连接液进行转化实验[d]。

a. 通常准备 50~100 ng 载体。
b. 准备约 3 倍量(按摩尔比)的插入 DNA。例如，50 ng 载体 DNA(3 kb)需加入 DNA 量的计算公式为：3 (kb)∶1 (kb)=50 (ng)∶x (ng)
x=17 ng(等摩尔量)
x×3(倍摩尔)=50 ng。

c. 吸取 T4 DNA 连接酶时应注意：
◆ 酶极易失活，绝不可于室温下操作；
◆ 酶加入到反应体系后，不可使用旋涡混合器进行混合，这将导致酶失去活性；
◆ 用微量移液器吸打方式来混匀反应体系。
d. 不可用加热方式对酶进行失活，否则转化率将降低。连接产物可保存在–20℃。

第五节　插入 DNA 的修饰与改造

以上介绍的 DNA 重组方法是建立在载体与插入 DNA 都含有合适酶切位点的前提下，但插入 DNA 或载体常常不存在合适切点，这时需对插入 DNA 或载体 DNA 进行修

饰与改造。本节仅介绍插入 DNA 的修饰与改造流程(图 12-4) [a]。

a. 该操作流程也可用于载体的修饰。

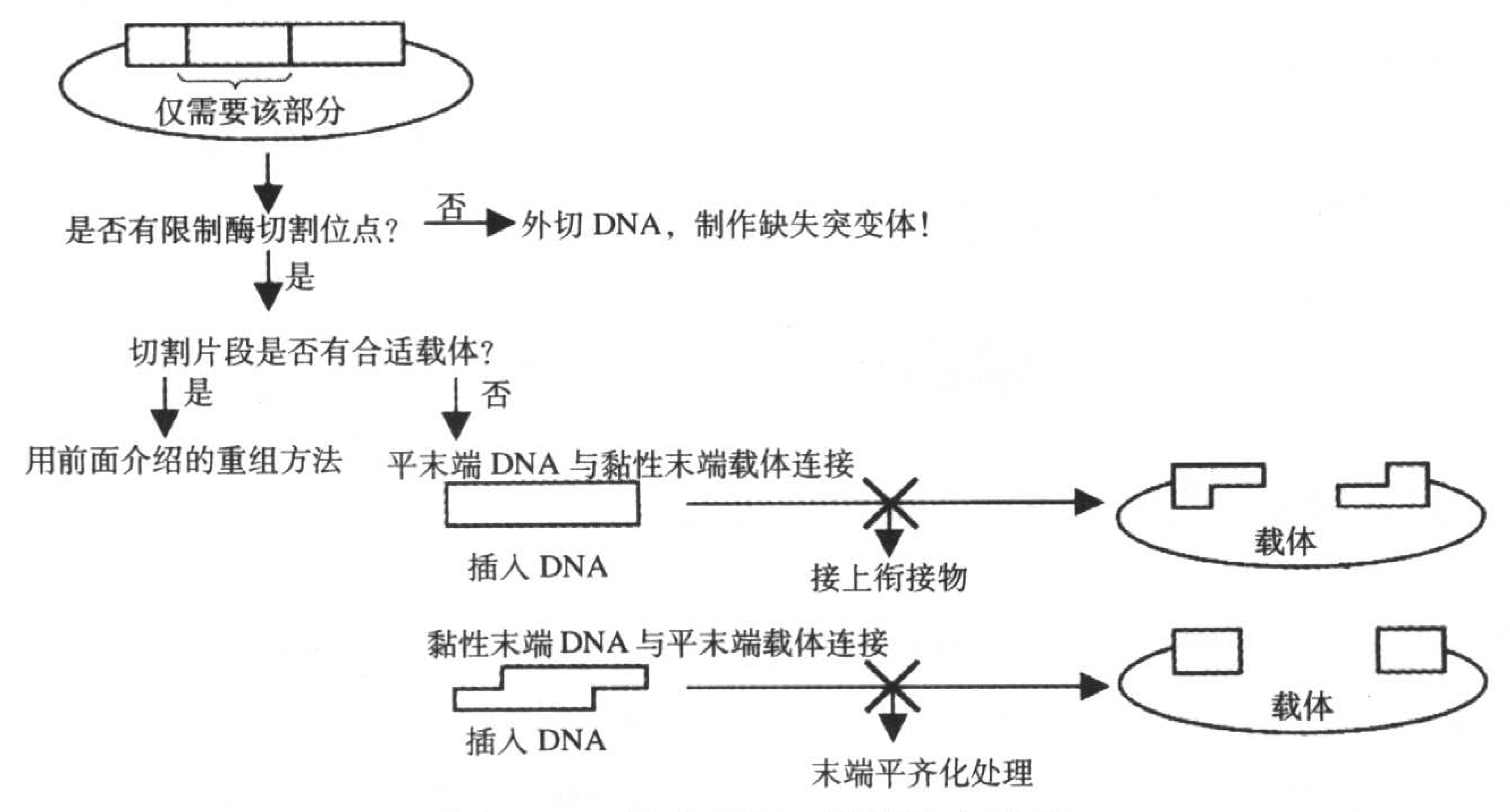


图 12-4　插入 DNA 的修饰与改造

1. 衔接物介导的连接

用于平末端插入 DNA 与黏性末端载体之间的连接。所谓衔接物，是指用化学方法合成的一段由 10~30 个核苷酸组成的、具有一个或数个限制酶识别位点的平末端双链寡核苷酸片段。由于衔接物 DNA 内具有酶切识别位点，在与平末端插入 DNA 连接后，再用限制酶切割，所得片段末端是黏性的(图 12-5)，从而可按上面的重组方法获得重组体。市场上现有各种各样的衔接物销售，也可根据实验自行设计衔接物，然后合成寡聚体 DNA，再通过退火配对，即成衔接物。

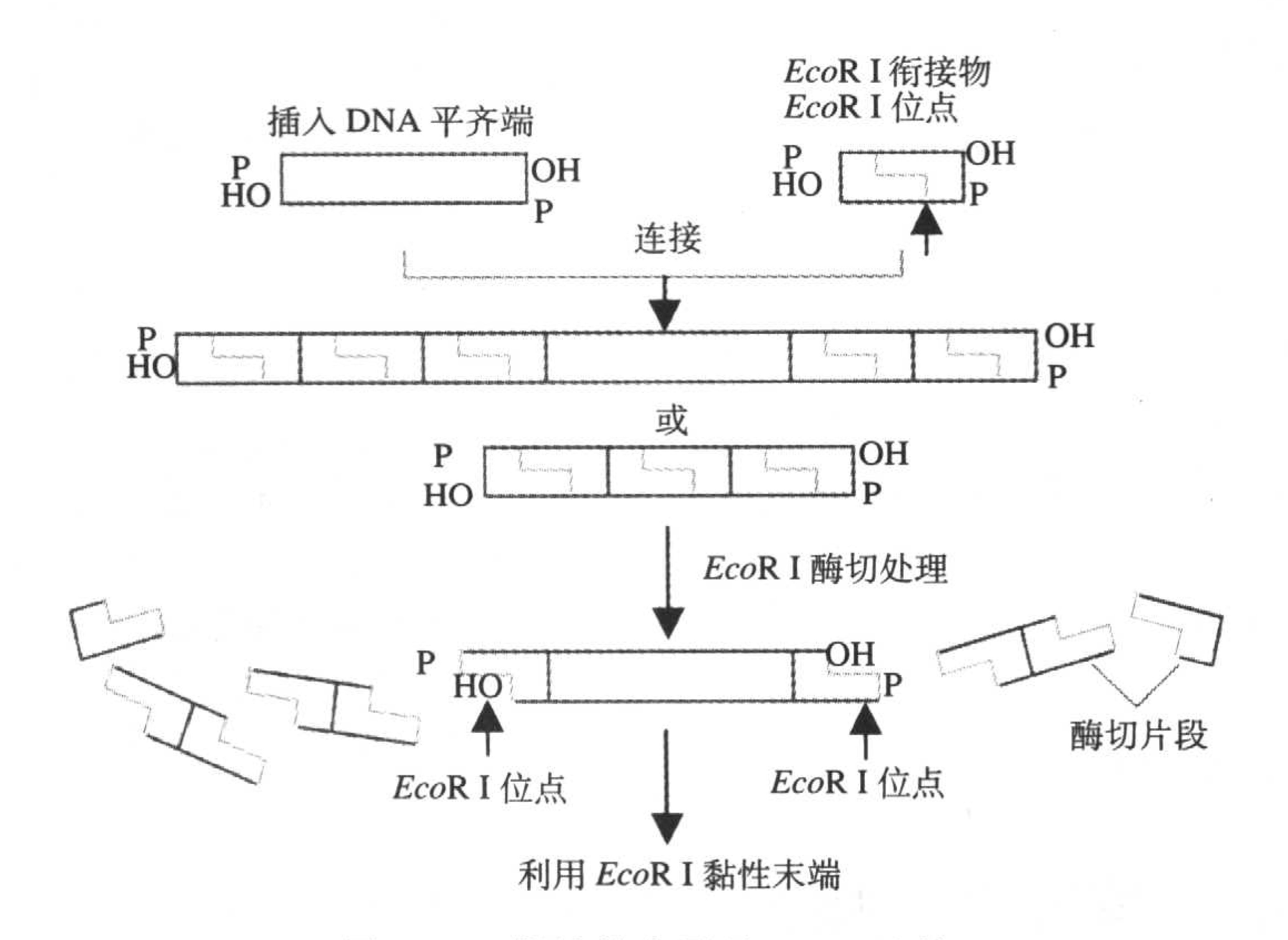


图 12-5　衔接物介导的 DNA 连接

1) 衔接物制备

Materials

除聚丙烯酰胺凝胶电泳所需设备、试剂外，还应准备以下器械和试剂：

(1) 95℃恒温水浴锅

(2) 37℃恒温水浴锅

(3) 台式离心机

(4) 旋涡混合器

(5) 离心干燥机

(6) 双蒸水

(7) 寡聚核苷酸(能形成互补、长度为 10~30 mer 的寡聚核苷酸)

(8) T4 DNA 聚合酶(T4 PNK)

(9) TEN (TE + 100 mmol/L NaCl)

(10) 添加缓冲液

500 mmol/L Tris・HCl(pH8.0)(附录一)

100 mmol/L $MgCl_2$(附录一)

50 mL DTT(附录一)

(11) 10 mmol/L ATP

(12) 100%丁醇

(13) 苯酚/氯仿/异戊醇(附录一)

(14) 3 mol/L NaAc(pH5.2) (附录一)

(15) 100%、70%预冷乙醇

(16) 0.5 mol/L EDTA

Protocols　　　　Time：6 h

(1) 寡聚核苷酸磷酸化

ⓐ 混合以下试剂[a]：

寡核苷酸	5 μL/500 pmol
10×T4 PNK 缓冲液	2 μL
10 mmol/L ATP	2 μL
T4 PNK[b]	5 U/0.5 μL

用双蒸水定容至 20 μL

↓

ⓑ 37℃温浴 30 min。

↓

ⓒ 加 1 μL 0.5 mol/L EDTA 终止反应。

↓

ⓓ 加 80 μL 双蒸水。等体积苯酚/氯仿/异戊醇抽提。

↓

ⓔ 加 1/10 体积 3 mol/L NaAc 混匀后，再加 2.5 倍体积 100%预冷乙醇，再混匀。

↓

ⓕ 按常规乙醇沉淀、漂洗方法操作，干燥沉淀。

↓

ⓖ 沉淀溶于 10 μL 双蒸水中。

(2) 互补配对

ⓐ 与等摩尔(200~500 pmol)互补配对的寡核苷酸混合，用 TEN 定容至 50 μL。

↓

a. 不必对双链都磷酸化处理。若只对某一链进行磷酸化处理，则不与另一衔接物分子连接(自连成二聚体、三聚体等多聚体)，而仅与特异的插入 DNA 连接。

b. T4 PNK 操作注意事项：

◆ 酶极易失活，注意低温操作；

◆ 反应液中添加酶后，不可用旋涡混合器等振荡；

◆ 用微量移液器吸打方式混匀。

ⓑ 混匀后 95℃温育 5 min。

↓

ⓒ 室温下缓慢降温[c]。

c. 绝不能用冰骤冷，否则无法产生互补配对。

(3) 聚丙烯酰胺凝胶电泳

ⓐ 配制聚丙烯酰胺凝胶，电泳。

↓

ⓑ 加 EB 染色，回收目的 DNA 带。

(4) DNA 回收

ⓐ 熔化凝胶，用丁醇浓缩上清。

↓

ⓑ 浓缩至 200 μL 以下体积，加 1/10 量 3 mol/L NaAc，混匀。再加 2.5 倍体积预冷 100% 乙醇，再混匀。

↓

ⓒ 按(1)的ⓕ进行乙醇沉淀、漂洗、干燥。

↓

ⓓ 溶解于 10~20 μL 双蒸水，测 A_{260} 值。

2) 与衔接物连接

Materials

(1) DNA 快速连接试剂盒(Roche Diagnostics 公司)
  - DNA 稀释缓冲液(5×)
  - T4 DNA 连接缓冲液(2×)
  - T4 DNA 连接酶

(2) 双蒸水

(3) 平末端 DNA

(4) 衔接物 DNA

Protocols　　Time：30 min

ⓐ 混合以下试剂：

平末端 DNA	x ng
衔接物 DNA	y ng[d]
DNA 稀释缓冲液(5×)	1 μL

用双蒸水定容至 5 μL

d. 加插入 DNA 10~20 倍摩尔比的衔接物。

↓

ⓑ 混匀。

↓

ⓒ 加 5 μL T4 DNA 连接缓冲液(2×)，混匀。

↓

ⓓ 加 0.5 μL T4 DNA 连接酶，用微量移液器吸打混匀。

↓

ⓔ 室温放置 5 min 以上[e]。

↓

ⓕ 酶切处理，产生黏性末端[f]。

e. 连接效率低时，延长至 30 min。
f. 乙醇沉淀反应液，或直接进行酶切处理。酶切后务必用电泳方法回收特定 DNA 带，以去除残余的衔接物。

2. 甲基化衔接物介导的连接

如果衔接物中的酶切位点同时存在于目的 DNA 中，则不能直接用上述方法酶切消化 DNA，否则目的 DNA 将被切成多个片段。为此，需要对目的 DNA 进行甲基化处理，以保护目的 DNA(图 12-6)。

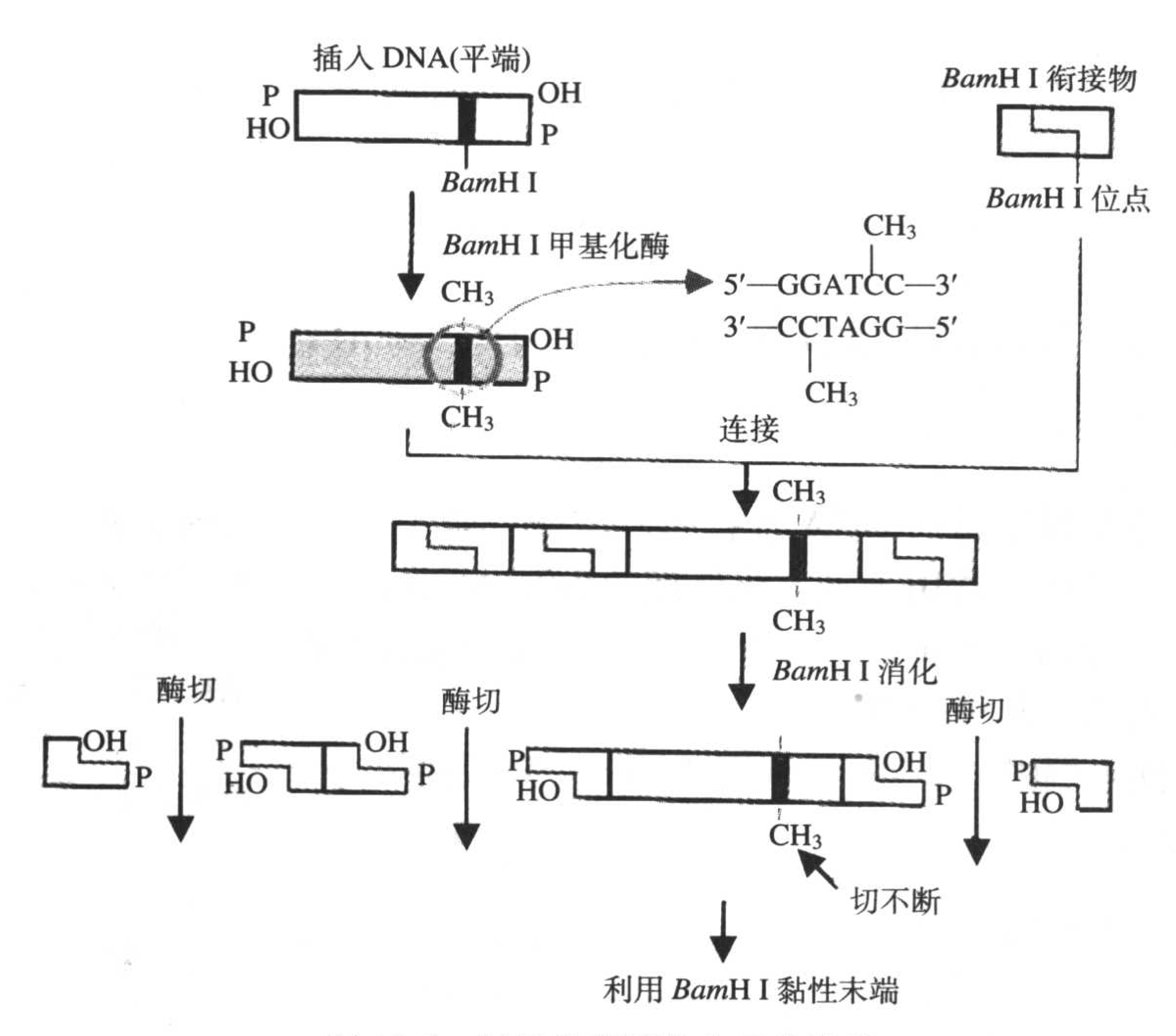


图 12-6 甲基化衔接物介导的连接

Materials

除聚丙烯酰胺凝胶电泳所需设备、试剂外，还应准备以下物品：

(1) 37℃恒温水浴锅
(2) 台式离心机
(3) 旋涡混合器
(4) 离心干燥机
(5) DNA(包括插入 DNA 等)
(6) 双蒸水
(7) 苯酚/氯仿/异戊醇(附录一)
(8) 3 mol/L NaAc(pH5.2) (附录一)
(9) 100%预冷乙醇和 70%预冷乙醇
(10) *Bam*H I 甲基化酶
(11) 10×*Bam*H I 甲基化酶添加缓冲液
(12) S-腺苷甲硫氨酸(甲基化供体)

Protocols　　Time：1 h

ⓐ 混合以下试剂：

DNA	0.5~0.2 μg

10×添加缓冲液	2 μL
2.5 mmol/L S-腺苷甲硫氨酸[a]	0.64 μL
*Bam*H I 甲基化酶[b]	10 U/μg DNA

用双蒸水定容至 20 μL

↓

ⓑ 37℃温育 15 min。

↓

ⓒ 补加 80 μL 双蒸水，苯酚/氯仿/异戊醇抽提。

↓

ⓓ 加 1/10 量 3 mol/L NaAc，按常规方法进行乙醇沉淀。

↓

ⓔ 离心干燥。

↓

ⓕ 溶于 10~20 μL 双蒸水中。此 DNA 溶液可用于与 *Bam*H I 衔接物的连接反应。

a. S-腺苷甲硫氨酸使用浓度为 2.5 mmol/L，但在此浓度下极不稳定，用后弃之。
b. 使用甲基化酶的注意事项：
◆ 酶极易失活，应在低温下使用；
◆ 不可使用旋涡混合器；
◆ 酶加入反应体系后，用微量移液器吸打方式混匀。

3. 黏性末端的平齐处理

平末端载体与黏端插入 DNA 连接时，需要对插入 DNA 黏端进行平齐化处理。常用于平齐化处理的酶有 Klenow 片段、T4 DNA 聚合酶、BAL31 核酸酶等。由于黏性末端有两种结构，因此有以下几种处理方式：

(1) 5′ 黏性末端(图 12-7A)：利用 Klenow 片段的 5′→3′ DNA 聚合酶活性[a]。

a. 可利用 T4 DNA 聚合酶的 5′→3′聚合酶活性，但由于其具有较强的外切双链 DNA 3′端的活性，技术上很难控制。因此，5′黏性末端的平齐化处理宜用 Klenow 片段。

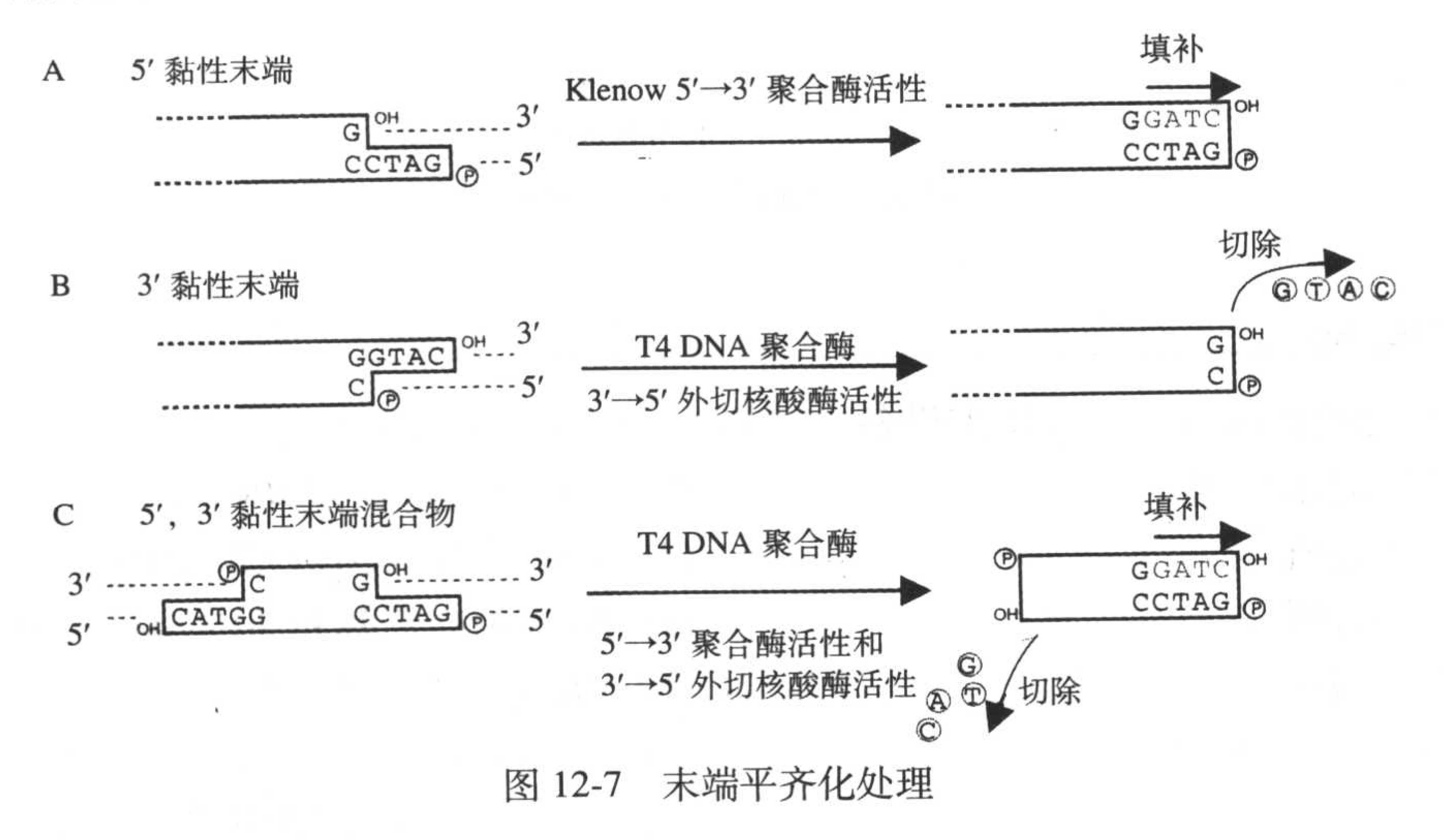


图 12-7　末端平齐化处理

(2) 3′黏性末端(图 12-7B)：利用 T4 DNA 聚合酶的 3′→5′ 外切核酸酶活性。

(3) 上述 2 种黏性末端的混合物(图 12-7C)：利用 T4 DNA 聚合酶的 3′→5′外切核酸酶活性和 5′→3′ DNA 聚合活性。

1) Klenow 片段参与的 5′黏性末端的平齐处理

Materials

(1) 37℃恒温水浴锅

(2) 双蒸水

(3) 欲平齐处理的 DNA

(4) Klenow 片段

(5) 0.5 mmol/L dNTP (各浓度为 0.5 mmol/L)

(6) 10×添加缓冲液

100 mmol/L Tris · HCl(pH7.5) (附录一)

70 mmol/L $MgCl_2$(附录一)

1 mmol/L DTT(附录一)

Protocols　　Time：1 h

ⓐ 混合以下试剂：

DNA	0.1~4 μg[b]
10×缓冲液	2 μL
0.5 mmol/L dNTP	1 μL
Klenow 片段[c]	1~5 U

用双蒸水定容至 20 μL

↓

ⓑ 37℃温育 15~30 min。

↓

ⓒ 75℃温育 10 min 以终止反应[d]。

↓

ⓓ 酚/氯仿抽提、乙醇沉淀，备用。

b. 由于酶切反应液中含有 Klenow 必需的 Mg^{2+}，因此，酶切完成后可直接添加 Klenow 片段、dNTP 进行平齐处理。

c. Klenow 片段使用时的注意事项：

◆ 酶极易失活，应低温操作；

◆ 不可使用旋涡混合器；

◆ 酶加入反应体系后，用微量移液器吸打方式混匀。

d. 可用酚/氯仿抽提方式使酶失活。

2) T4 DNA 聚合酶参与的 3′黏性末端或 3′与 5′混合黏性末端的平齐处理

Materials

(1) 12℃、75℃恒温水浴锅

(2) 双蒸水

(3) 待平齐处理的 DNA

(4) T4 DNA 聚合酶

(5) 2 mmol/L dNTP(各浓度为 2 mmol/L)

(6) 10×缓冲液

100 mmol/L Tris · HCl(pH7.5) (附录一)

70 mmol/L $MgCl_2$(附录一)

1 mmol/L DTT(附录一)

Protocols　　Time：1 h

ⓐ 混合以下试剂：

DNA	0.1~4 μg[e]
10×缓冲液	2 μL[f]
2 mmol/L dNTP	1 μL
T4 DNA 聚合酶[g]	1~5 U

e. 由于酶切体系中含有 T4 DNA 聚合酶必需的 Mg^{2+}，因此，酶切反应完成后，可直接添加 T4 DNA 聚合酶、dNTP 进行平齐化处理。

用双蒸水定容至 20 μL

↓

ⓑ 12℃温育 15 min[h]。

↓

ⓒ 75℃温育 15 min。

↓

ⓓ 酚/氯仿抽提[i]、乙醇沉淀，备用。

f. 利用 T4 DNA 聚合酶单链 DNA 3′→5′ 外切核酸酶活性时，也必须加 dNTP。这是因为在无 dNTP 的反应体系中，其双链 DNA 3′→5′ 外切核酸酶活性提高。但在 dNTP 存在下(且在低温条件下)，其双链 3′→5′ 外切核酸酶活性与 5′→3′ 聚合酶活性处于平衡状态，因此，可阻止双链 DNA 降解。

g. T4 DNA 聚合酶操作注意事项：

- 酶极易失活，应低温操作；
- 不可使用旋涡混合器来混匀体系；
- 酶加入反应体系后，应用吸打方式混匀。

h. 37℃下，T4 DNA 聚合酶双链 DNA 3′→5′ 外切核酸酶活性是 5′→3′ 聚合酶活性的 3 倍。但在 11~12℃条件下，二者处于平衡状态。因此，酶反应应在低温下进行，避免双链的降解。

i. 酚/氯仿抽提也可使 T4 DNA 聚合酶失活。

4. 外切 DNA

是对无合适酶切位点的插入 DNA 进行修饰、改造的一种有效方法。

1) BAL31 核酸酶

该酶既有单链内切核酸酶活性，又有双链外切核酸酶活性。当底物为双链环状 DNA，其单链内切核酸酶活性对单链切口或瞬时单链区产生降解，从而将超螺旋 DNA 切割成开环结构，进而成为线性双链 DNA 分子。当底物是线性双链 DNA，其双链外切核酸酶活性从 3′ 和 5′ 两端切割 DNA。

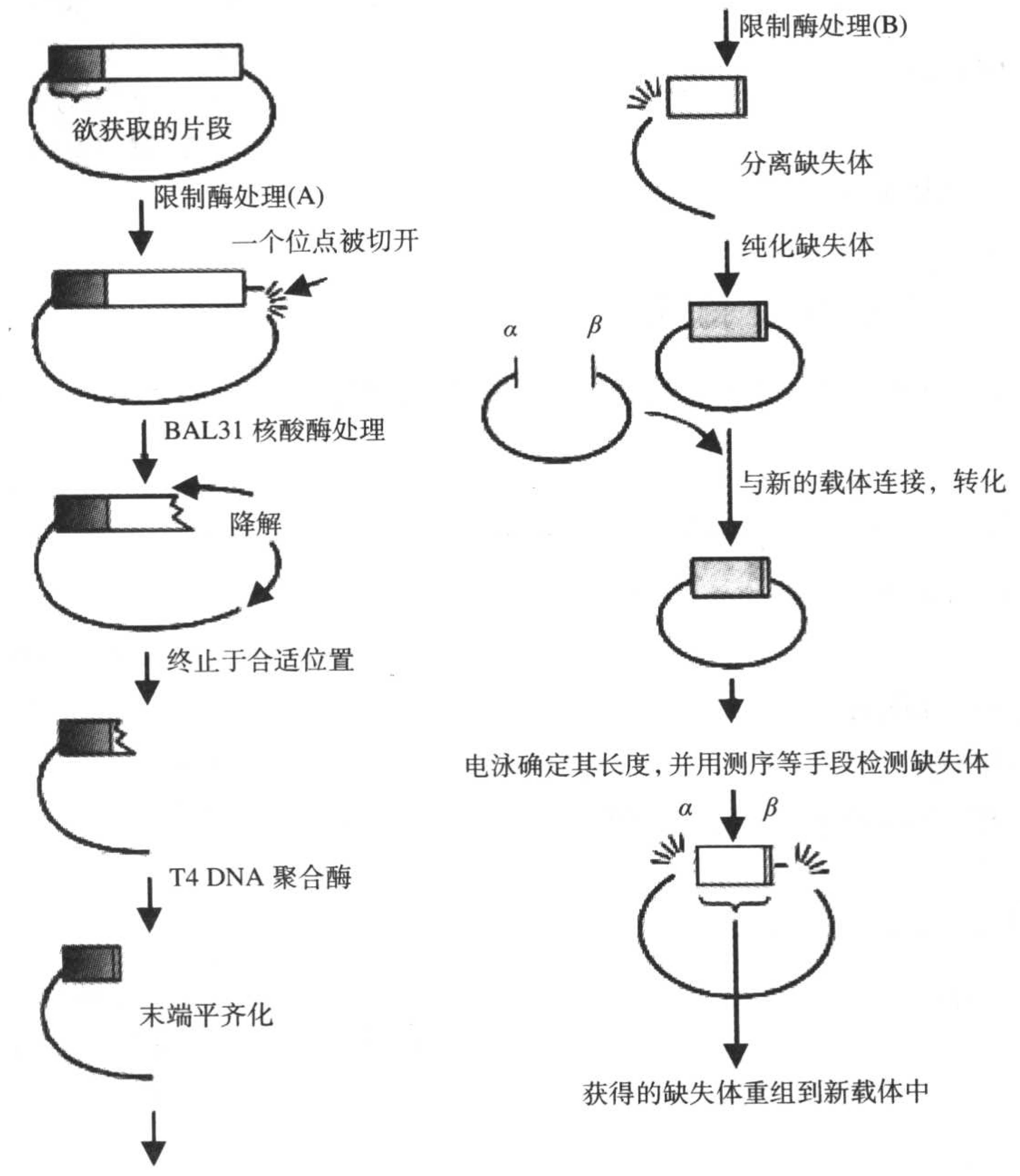


图 12-8　缺失突变体制备流程

利用 BAL31 核酸酶外切 DNA，DNA 长度宜在 100~1000 bp 以上[a]，外切 DNA 产物为平末端(占 10%左右)、5′或 3′黏性末端等混合物。外切速率与序列组成及末端结构有关，G·C 含量丰富的区段外切较困难。因此，两端外切速率是不均匀的，但这种不均一的外切可通过温度调节来控制。如 37℃/20℃交替反应，可调节其切割速度。

a. 100 bp 以下的外切，宜用外切核酸酶 III(3′→5′双链外切核酸酶活性)和 S1 核酸酶(单链 DNA 外切核酸酶活性)两种酶共同作用。

图 12-8 是获取缺失突变体的实验流程。获取需要的缺失体后，再重组到合适载体中确定其功能。

Materials

除琼脂糖电泳必需的设备和试剂外，还需准备以下器械和试剂：

(1) 限制性内切核酸酶及 T4 DNA 聚合酶处理必需设备和试剂
(2) 30℃恒温水浴锅
(3) 台式离心机
(4) 旋涡混合器
(5) 离心干燥机
(6) 双蒸水
(7) 待外切的缺失体 DNA
(8) 限制酶必需试剂
(9) BAL31 核酸酶
(10) 5×BAL31 缓冲液
  100 mol/L Tris·HCl(pH8.0) (附录一)
  3 mol/L NaCl
  60 mmol/L $CaCl_2$(附录一)
  60 mmol/L $MgCl_2$(附录一)
  5 mmol/L EDTA
(11) T4 DNA 聚合酶及相关试剂
(12) 苯酚/氯仿/异戊醇(附录一)
(13) 3 mol/L NaAc(pH5.2) (附录一)
(14) 预冷 100%、70%乙醇

Protocols　　Time：4 h

(1) 用限制酶切割以制备带有末端的 DNA

ⓐ 用合适限制酶在载体某一位点上产生切割。

↓

ⓑ 加 1/10 量 3 mol/L NaAc，乙醇沉淀、漂洗。

↓

ⓒ 离心干燥，溶于 20~50 μL 双蒸水中。

(2) BAL31 核酸酶处理

ⓐ 混合以下试剂：

前一操作所得 DNA	3 μg
5×缓冲液	20 μL
BAL31 核酸酶[a]	5 μL

用双蒸水定容至 100 μL

↓

ⓑ 30℃温育适当时间[b,c]。

↓

ⓒ 加等量苯酚/氯仿/异戊醇，旋涡混匀，以使酶失活。

a. BAL31 核酸酶使用时应注意：
◆ 酶极易失活，应低温操作；
◆ 不可使用旋涡混合器；
◆ 酶加入反应体系后，应用微量移液器吸打方式混匀。
b. 应做预实验，确定反应条件。
c. 若要获取不同长度的缺失突变体，应每隔一定时间(如 5 min)取出一定反应液于酚/氯仿溶液中以终止反应。

↓

ⓓ 加 1/10 体积 3 mol/L NaAc，乙醇沉淀、漂洗。

↓

ⓔ 离心干燥，溶于 15 μL 双蒸水中。

2) 用 T4 DNA 聚合酶进行末端平齐处理

Protocols

ⓐ 混合以下试剂：

前一操作所得 DNA	15 μL
10×缓冲液	2 μL
0.5 mmol/L dNTP	1 μL
T4 DNA 聚合酶	1~5 U

用双蒸水定容至 20 μL

↓

ⓑ 12℃温育 15 min。

↓

ⓒ 加等量苯酚/氯仿/异戊醇，立即旋涡混匀，以终止反应。

↓

ⓓ 加 1/10 体积 3 mol/L NaAc，然后进行乙醇沉淀、漂洗。

↓

ⓔ 离心干燥，溶于 10~20 μL 双蒸水中。

3) 其他操作

Protocols

ⓐ 用合适的限制性内切核酸酶切割缺失体 DNA，电泳回收 DNA。

↓

ⓑ 将该 DNA 与载体连接，转入大肠杆菌。

↓

ⓒ 插入片段的检测或功能分析。

第六节　转　化

外源 DNA 插入到载体后，通过转化导入感受态细胞，平板培养获取单菌落。

对于 $CaCl_2$ 法或改良 Hanahan 法，通常取 1/10~1/5 体积的连接物加入到 100 μL 感受态细胞中。由于添加的连接物体积不能过大，但又须将全部连接物加入到感受态细胞，则应先用乙醇沉淀方法浓缩连接物，以缩小连接物体积。若不知道可能长出的菌落数，建议取 1 mL 转化液的 1/10 铺一平板，剩余的 9/10 经离心浓缩后铺另一平板。

对于电转化法，不能取连接物直接用于转化，需对连接物进行乙醇沉淀、漂洗、干燥等处理，以除去连接物中的盐分。

详细流程参见第八章。

第七节　重组子筛选

转化获得的重组体并不一定是预期所需的，其中可能包括：载体自连、多拷贝插入DNA、反向连接及各种可能的突变(插入 DNA 或载体 DNA)等不需要的重组子，因此需对重组体筛选。筛选方法有以下几种：

(1) 提取并纯化质粒，依靠酶切或测序等手段检测插入 DNA 是否正确；
(2) PCR 筛选；
(3) 菌落杂交；
(4) 蓝白筛选(仅针对某些宿主菌和载体)。

1. 质粒酶切法筛选重组子

重组质粒 DNA 被提纯后，用合适的限制性内切核酸酶消化。然后根据酶切图谱判断插入 DNA 是否以特定方向插入到载体的特定位置。

Materials

(1) 连接转化体的平板
(2) 大肠杆菌培养相关设备和试剂
(3) 琼脂糖凝胶电泳相关设备及试剂
(4) 酶切处理相关设备及试剂

Protocols　　Time：5 h

ⓐ 挑选连接转化体单菌落至新平板上，并接种于 2 mL 液体培养基中。
↓
ⓑ 碱裂解法提取质粒 DNA。
↓
ⓒ 用限制性内切核酸酶消化适量 DNA。
↓
ⓓ 琼脂糖凝胶电泳。
↓
ⓔ 分析电泳图谱(图 12-9)。

2. PCR 法筛选重组子

由于载体序列都是已知的，因此可用 PCR 方法确定外源基因是否插入到载体特异位点或插入序列是否正确。该方法不但可以快速筛选大量克隆、确定插入方向，而且可以获得大量插入片段以用于进一步分析(如序列测定)。用于 PCR 筛选的模板可以是质粒DNA，也可以是菌落。

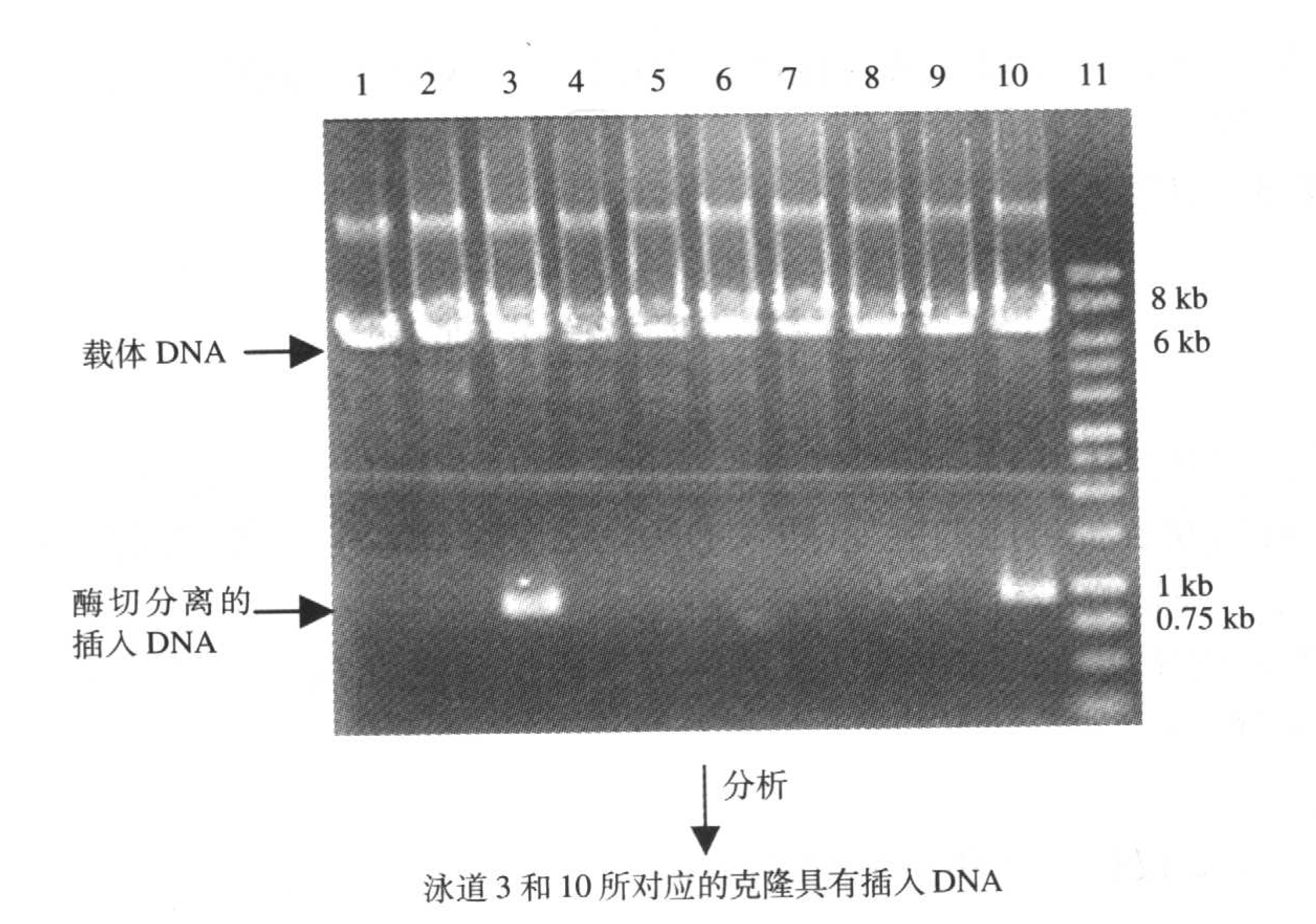


图 12-9　酶切法筛选重组子

7 kb 载体中插入 1 kb 外源 DNA，转化所获得的 9 个重组子进行了酶切筛选。泳道 1：载体 DNA 酶切片段；泳道 2~10：各重组子酶切片段；泳道 11：相对分子质量标准物

3. 菌落杂交法筛选重组子

将转化菌直接铺在硝酸纤维素薄膜或琼脂糖平板上，再转移至另一硝酸纤维素薄膜上，用同位素标记的探针进行杂交，筛选阳性克隆(图 12-10)。该方法能进行大规模操作，但必须使用同位素，操作复杂，而且需要再用其他方法进行验证，因此目前使用的人越来越少。

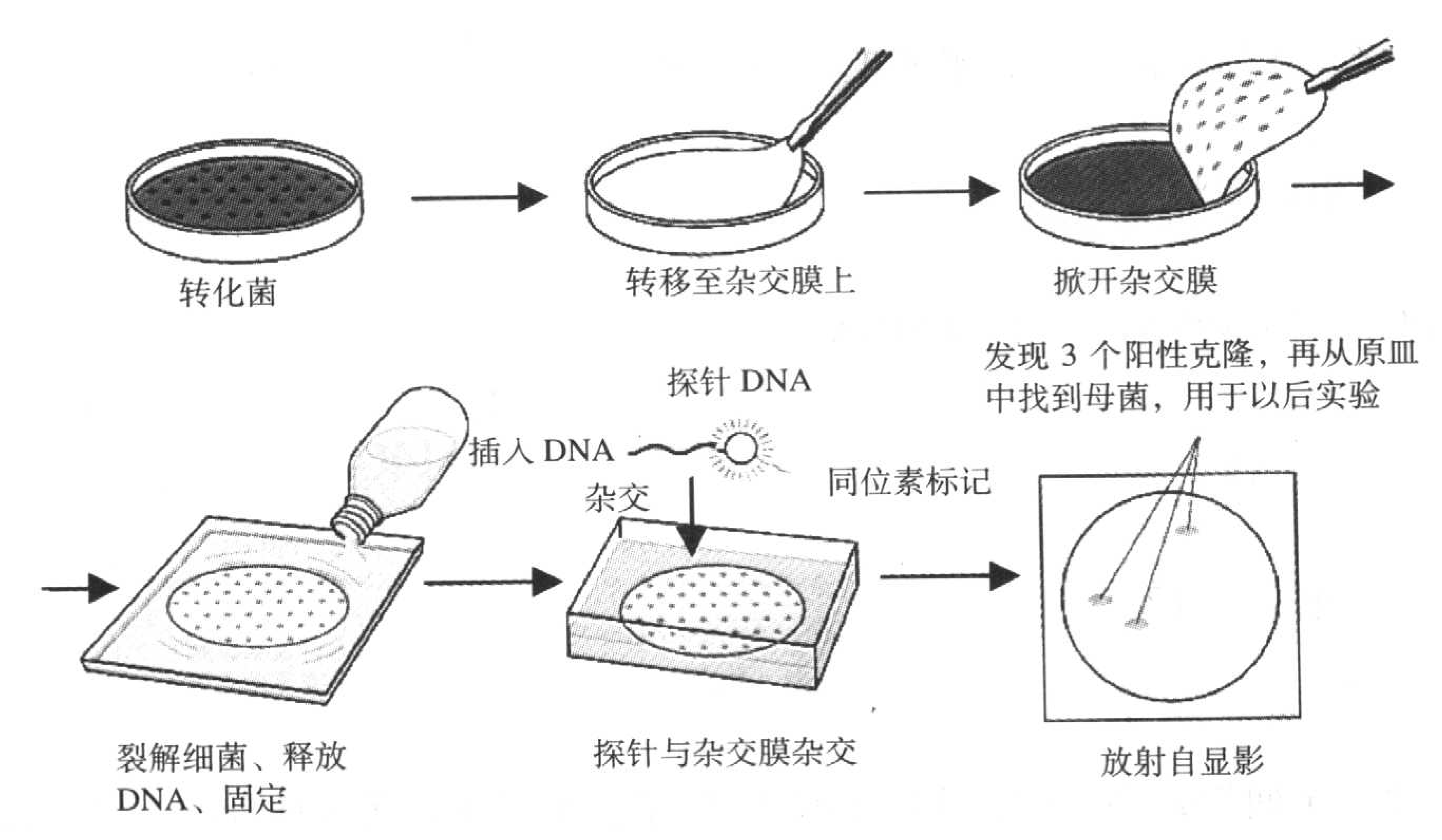


图 12-10　利用菌落杂交筛选重组子

4. 蓝白筛选法筛选重组子

用于这种筛选系统的载体含有 *lac*Z 标记基因，该标记基因由 2 部分组成，即大肠杆

菌 β-半乳糖苷酶基因调控序列和该酶氨基端 146 个氨基酸组成的 α-肽的编码序列。独立的 α-肽无活性。宿主菌染色体 DNA 上含有 β-半乳糖苷酶的另一编码序列(羧基端)，独立的羧基端也无活性。但当 α-肽与羧基端肽共存于一个个体时，无论在体内还是体外，两片段均能结合，产生出具完整酶活性的 β-半乳糖苷酶，可以将无色的底物 X-gal(5-溴-4-氯-3-吲哚-*D*-半乳糖苷)水解成蓝色产物，蓝色产物可使菌落呈蓝色，该反应过程被称为 α-互补作用。外源基因可以利用载体 *lac*Z 中的多克隆位点，插入载体构建重组体，并导致 *lac*Z 基因失活，从而破坏 α-互补作用，因而不能产生蓝色产物，菌落仍呈其本色(白色，实际上为浅黄色，但习惯上说是“白色”)。通过这种颜色改变的方法筛选重组子的技术叫蓝白筛选(图 12-11)，是目前广泛应用的方法之一。

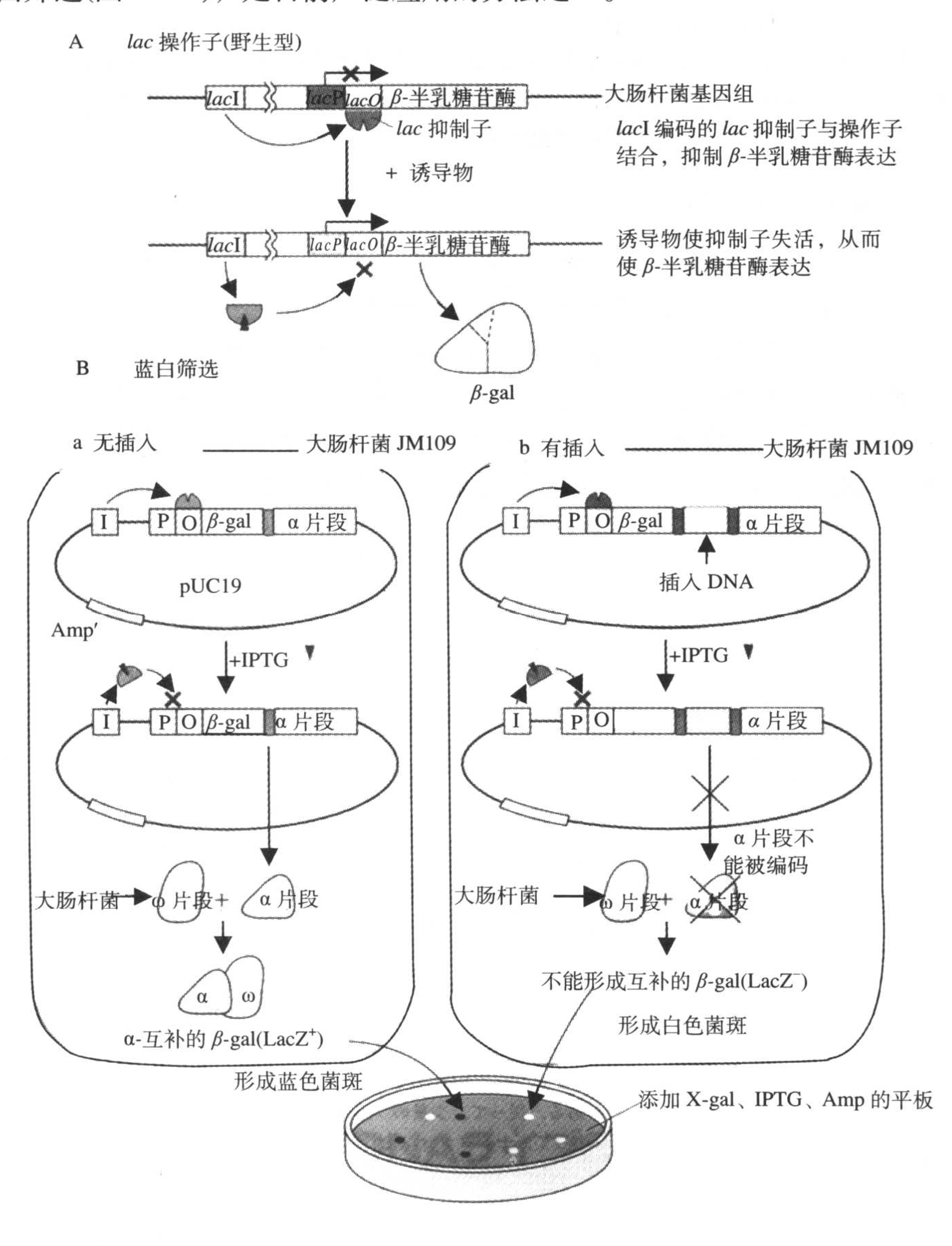
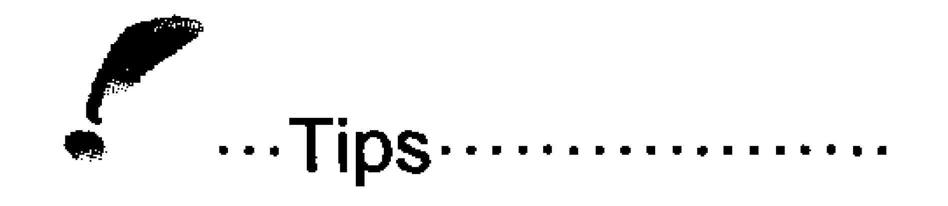


图 12-11 蓝白筛选原理



蓝色菌落未必都不含插入序列。若 DNA 很短、插入 DNA 编码框架与 β-半乳糖苷酶一致、作为融合蛋白质而被翻译等，表达的蛋白质仍表现很弱的 β-gal 活性，呈现出蓝白中间表型。

1. 常用的能进行 α-互补作用的宿主菌

(1) JM109：pUC 系列质粒、M13 噬菌体载体的宿主菌

(2) XL-Blue：λZAP II 噬菌体载体的宿主菌

(3) Y1090：λgt 11 宿主菌

2. 能用于蓝白筛选法筛选的载体

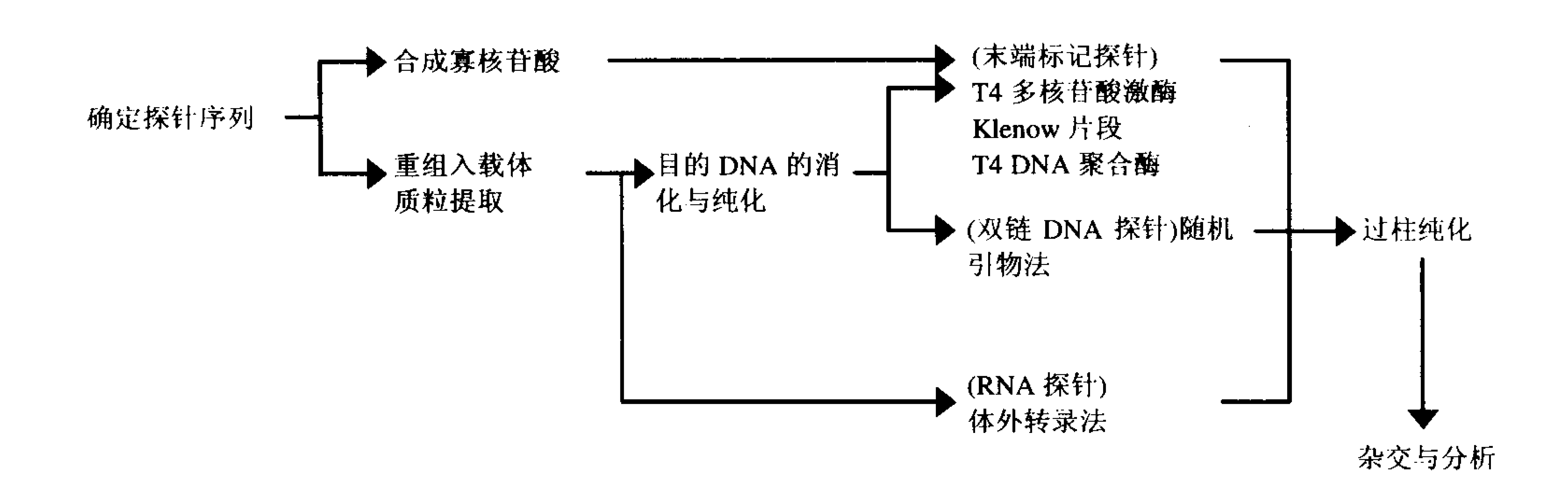
(1) pUC18、pUC19(大小为 2686 bp)：α-肽编码区内存在多克隆位点(MCS)。pUC18 的 MCS 与 pUC19 的 MCS 方向相反。具氨苄青霉素抗性。

(2) pBlueScript II(大小为 2961 bp)：α-肽编码区内存在多克隆位点。根据 *lac*Z 启动子方向分为 KS(*Kpn* I→*Sac*I)和 SK(*Sac*I→*Kpn*I)两种。又根据辅助噬菌体特性，分为“+”和“−”两类。“+”为 *lac*Z 正链，“−”为 *lac*Z 负链。具氨苄青霉素抗性。

…Questions………………

1. 试分析导致 DNA 重组实验失败的主要原因。
2. 什么叫载体自连？如何避免产生载体自连现象？
3. 重组子筛选的主要方法有哪些？如何根据实验情况选用合适的筛选方法？为什么？
4. 当用蓝白斑筛选重组子时，白色菌斑有可能并不是重组体，试分析其中的原因。
5. 用 α-互补现象筛选带有插入片段的重组克隆的主要原理是什么？
6. 用质粒载体进行外源 DNA 片段克隆时应主要考虑哪些因素？

第十三章 探针制备



第一节 探针标记法

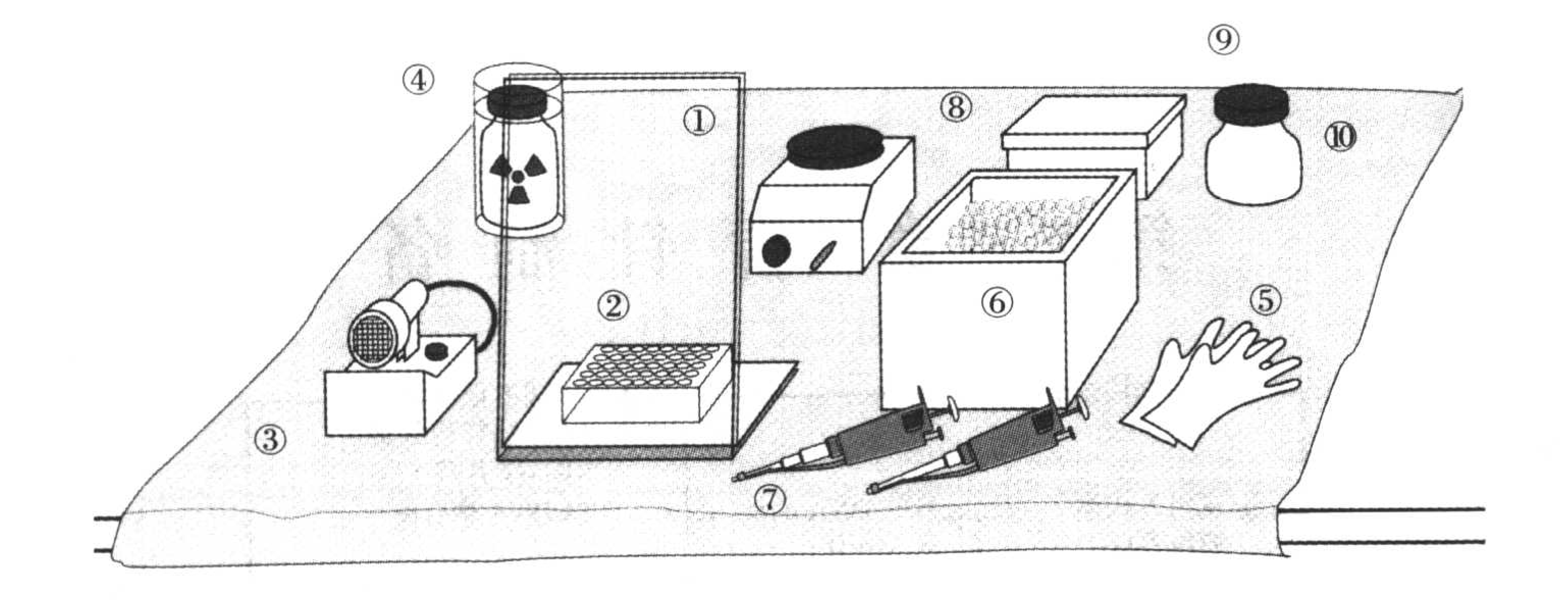
标记的核酸分子称探针，广泛用于基因组 DNA、cDNA 或 RNA 分析中。标记方法有同位素标记和非同位素标记两大类。同位素标记灵敏度高、操作简便，是常用的方法。表 13-1 列举了探针标记法的种类与用途。菌落筛选、Southern 印迹、Northern 印迹等需要用比活力高的较长 DNA 探针，此时使用随机引物法、缺口平移法进行标记。这些标记方法对于较短 DNA(200 bp 以下)的标记效率极低，此时应使用末端标记法。

表 13-1 探针标记方法及用途

标记种类	用途
双链 DNA 探针	用于较长双链 DNA 的筛选
•随机引物法	Southern 印迹
	Western 印迹
末端标记	用于较短寡核苷酸的筛选
•T4 多核苷酸激酶	Southern 印迹
•Klenow 片段	Western 印迹
•T4 DNA 聚合酶	足迹分析
	凝胶阻滞电泳分析
	引物外延
RNA 探针	原位杂交
•体外转录	RNase 保护分析



同位素实验应准备的物品：① 隔离板(丙烯树脂玻璃，防止射线直射)；② 架子；③ 盖革计数器(用于探测是否存在放射性)；④ 废物箱(盛放接触过同位素的枪尖、离心管等)；⑤ 一次性手套；⑥ 冰盒；⑦ 微量移液器；⑧ 旋涡混合器；⑨ 枪尖、离心管；⑩ 聚乙烯滤纸。



此外，还应注意以下几点：

(1) 实验前，用盖革计数器检测桌子、器械等是否被污染，污染的物品应尽快处理。

(2) 接触过同位素的废枪头、离心管等应及时弃入专用废物箱中。^{32}P、^{35}S、^{14}C 应分别装箱。废液也应分别处理。

(3) 移液器操作应特别谨慎，特别是移液杆，取液时应特别注意。

(4) 手套极易被污染，也极易污染其他物品，应勤换。

(5) 离开同位素室时，应仔细检查手、衣服、拖鞋等是否已被污染，手应勤洗。

(6) 进出同位素室的物品应尽量少，最好专用。若从同位素室带出器械应特别检查。

(7) 不要在同位素室内饮食、吸烟、睡觉。

第二节　随机引物法

随机引物与热变性的单链 DNA 互补退火后，在 Klenow 大片段酶的作用下，合成互补链。其原理如图 13-1。与缺口平移法相比较，随机引物法具有标记活性高、长时间反应替换率不降低、DNA 纯度对标记的影响小等优点。因此大有取代缺口平移法而成为最常用的 DNA 标记方法的趋势。

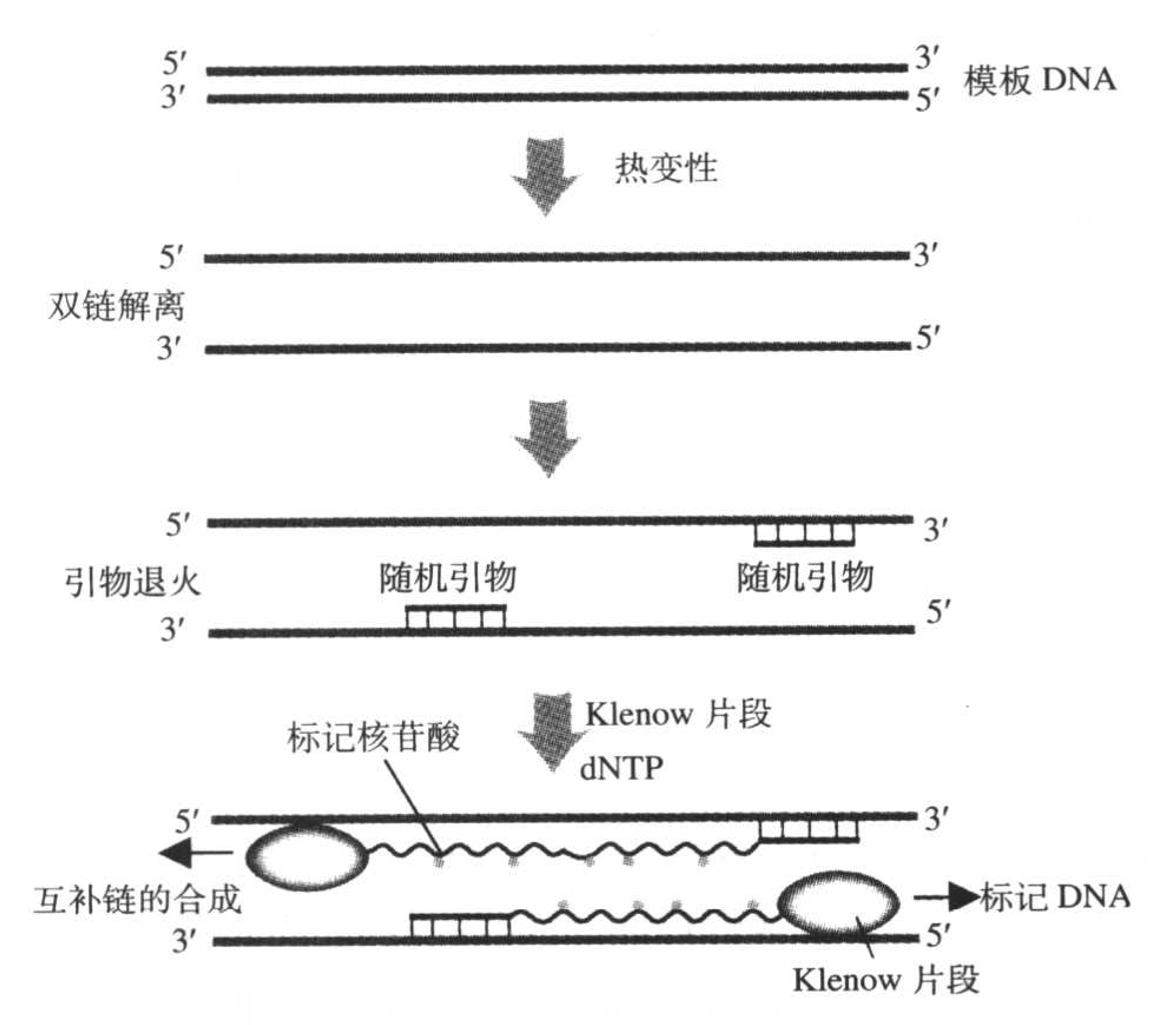


图 13-1　随机引物法的原理

Materials

(1) 随机引物标记试剂盒
(Roche Diagnostics 公司)
dATP、dGTP、dTTP (0.5 mmol/L)
反应混合物
Klenow 大片段(2 U/μL)

(2) [α-^{32}P] dCTP (3000 Ci/mmol)

Protocols　　Time：2 h

将恒温水浴锅预设为 95℃、37℃、65℃

ⓐ 用无菌水稀释待标记 DNA(25~200 ng)至 9 μL。

↓

ⓑ 95℃热变性 10 min 后，冰上骤冷[a]。

↓

ⓒ 向 DNA 溶液中加以下试剂。

dATP、dGTP、dTTP	各 1 μL(合计 3 μL)
反应混合物	2 μL
总体积	5 μL

↓

ⓓ 加放射性标记核苷酸(注意防止放射性污染)[b,c]。

[α-^{32}P] dCTP　　5 μL (50 μCi)

↓

ⓔ 添加 1 μL Klenow 大片段。

↓

ⓕ 用微量移液器吸打混匀，并轻甩数次，使之沉入管底。

↓

ⓖ 37℃保温 30 min。

↓

ⓗ 65℃保温 10 min，使酶失活。

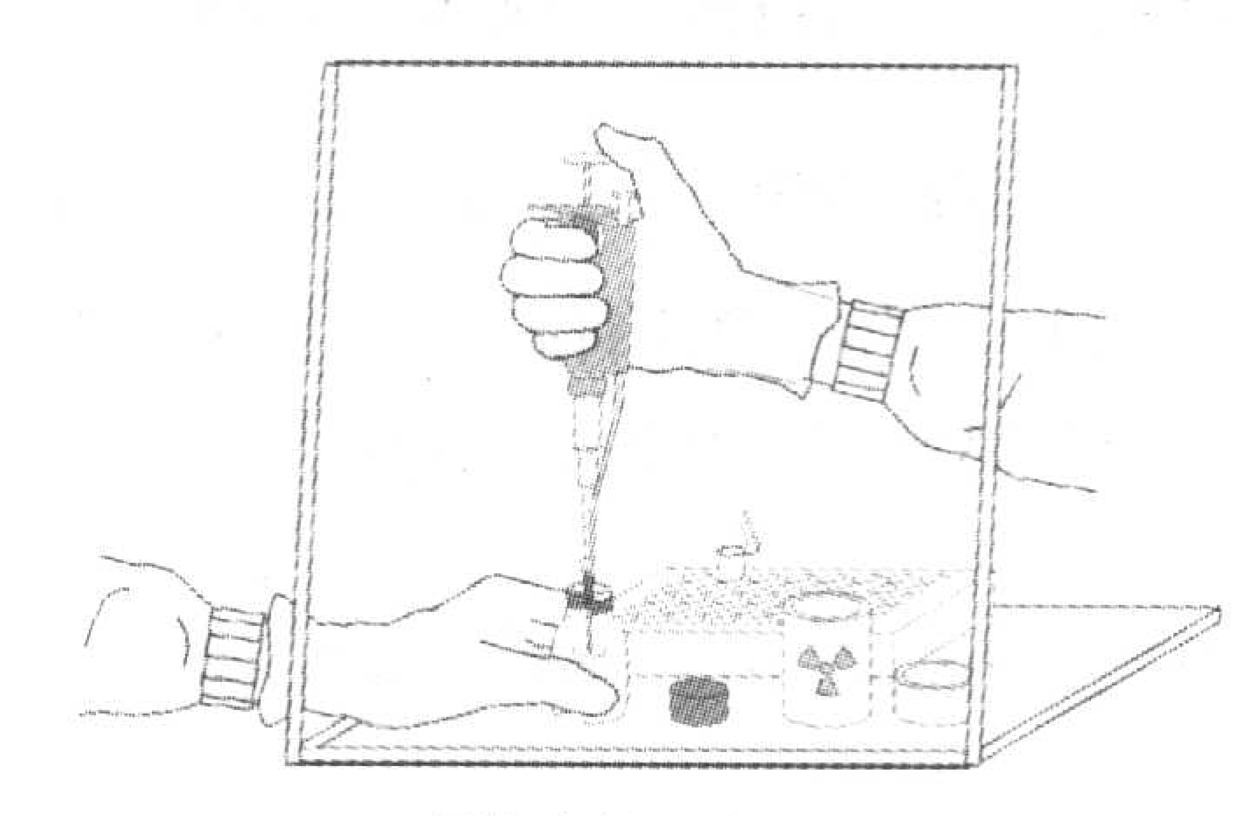
↓

ⓘ 根据需要，决定是否过柱[d]。

a. 热变性后若室温放置，DNA 又将复性成双链。

b. [α-^{32}P] dCTP、酶溶液(危险、昂贵、易失活)等应在最后加入。酶加入后，避免剧烈振荡，否则酶可能失去活性。

c. 同位素的吸取应如下图所示，戴上手套在隔离板内操作。吸取时还应注意微量移液器杆不要接触同位素试剂瓶的瓶口或内侧。吸取的同位素试剂转至新管后，应先将新管盖严，并轻甩几下，使试剂沉入管底，以防污染下一步操作。


同位素的吸取

d. 随机引物法标记的探针，比活力高，可直接用于杂交。但进行原位杂交时，最好用 Sephadex G-50 过柱，以除去残留的核苷酸。

第三节　末端标记法

用于标记较短的探针。根据探针末端的结构与用途，分 3 种方法。

1. T4 多核苷酸激酶

T4 多核苷酸激酶(T4 PNK)催化[γ-^{32}P]ATP 上的 γ^{32}P-磷酸转移到 DNA 5′ 端羟基上，

从而将 DNA 标记成探针(图 13-2)。该反应是可逆反应，磷酸化与脱磷酸化同时进行。其磷酸化效率与末端结构有关:单链末端>双链 5′ 黏性末端>双链平末端>双链 3′ 黏性末端。因此，切割双链 DNA 的酶最好选择产生 5′ 黏性末端的限制性内切核酸酶。

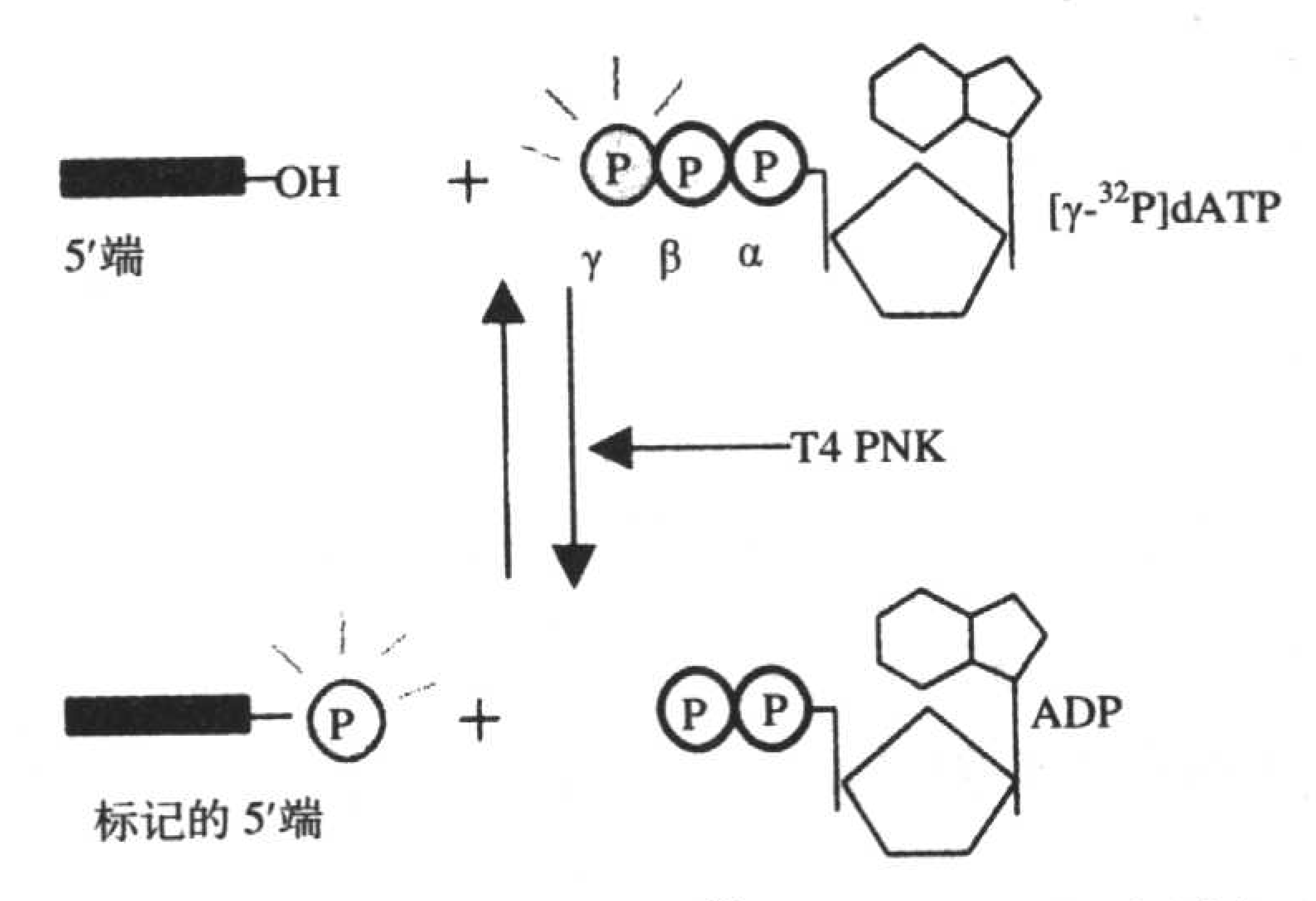


图 13-2 由 T4 PNK 和[γ-^{32}P] dATP 进行末端标记

Materials

(1) 脱磷酸的 DNA(2~20 pmol 5′ 端)
(2) MEGALABEL (TaKaRa 公司)
(3) 10×磷酸化缓冲液
(4) T4 PNK
(5) [γ-^{32}P] dATP(>3000 Ci/mmol)
(6) Sephadex G-50(Amersham Pharmacia Biotech 公司)(当 DNA 为数千碱基对时)
(7) Sephadex G-25(Amersham Pharmacia Biotech 公司) (当 DNA 为数百碱基对或更小时)

Protocols　　Time：2 h

预设恒温水浴锅温度至 37℃、65℃

ⓐ DNA 溶于 20.5 μL 双蒸水。

↓

ⓑ 加 2.5 μL 10×磷酸化缓冲液。

↓

ⓒ 加放射性标记的核苷酸(注意防止放射性污染)。

[γ-^{32}P]dATP　　1 μL (50 μCi) [a]

↓

ⓓ 加 1 μL T4 PNK。

↓

ⓔ 用微量移液器吸打混匀，并轻甩使之沉入管底。

↓

ⓕ 37℃保温 30 min。

↓

ⓖ 65℃保温 10 min，使酶失活。

↓

ⓗ 用 Sephadex G-50 或 G-25 除去未反应的[γ-^{32}P]dATP。

a. 难标记的 DNA 应增加同位素标记核苷酸量，此时应减少ⓐ的双蒸水量。

2. Klenow 大片段

用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 大片段对 DNA 3′ 端进行标记。先用 *Eco*R I 消化 DNA，再用[α-^{32}P]dATP 进行末端标记(图 13-3)。选用何种标记核苷酸取决于限制性内切核酸酶的种类(表 13-2)。

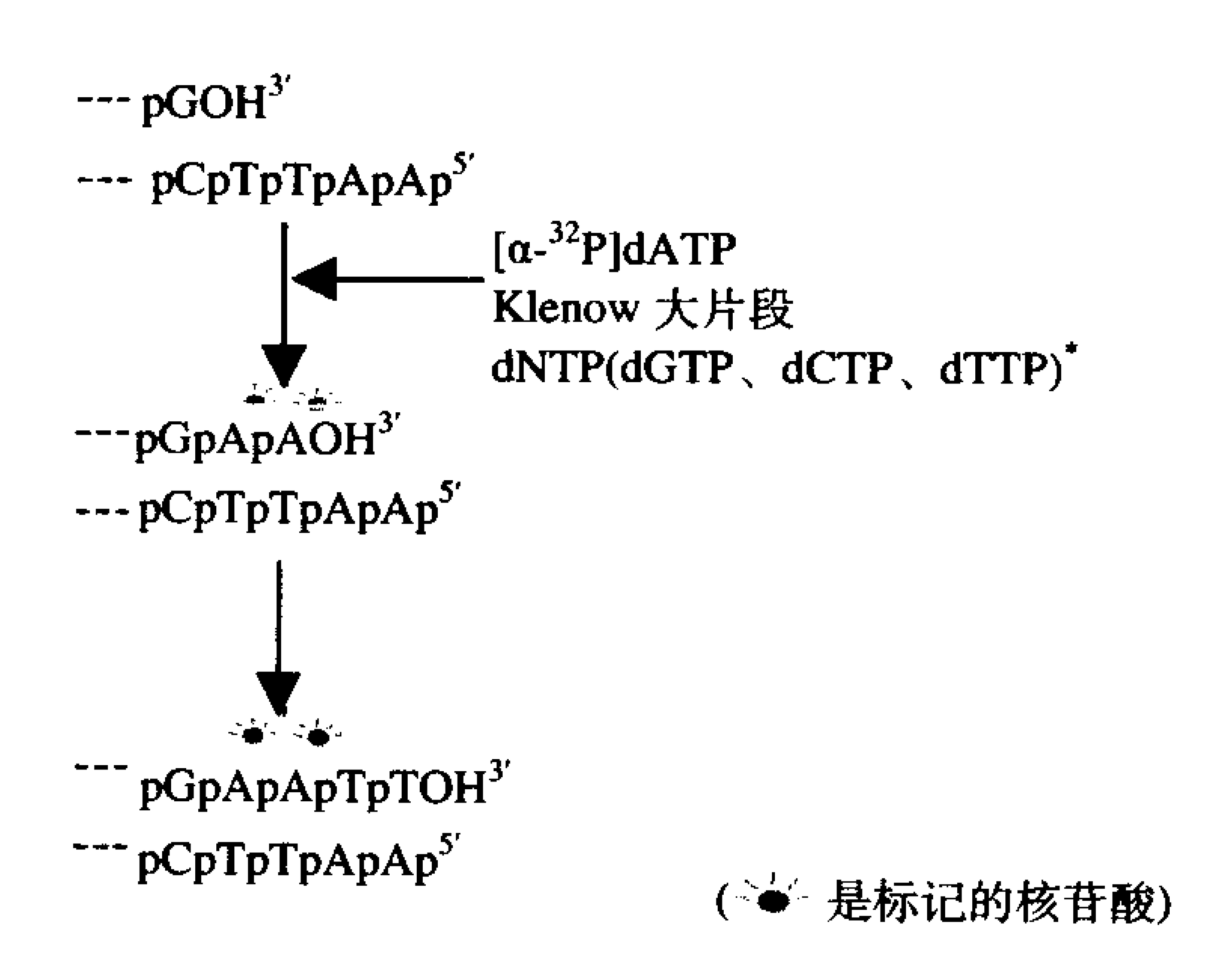


图 13-3 利用 Klenow 片段进行 3′ 端标记

* 表示该反应中可仅加 dTTP

表 13-2 主要限制性内切核酸酶所对应的标记[α-^{32}P]dNTP

限制性内切核酸酶	末端结构	[α-^{32}P]dNTP
*Bam*H I	G CCTAG	[α-^{32}P]dGTP、[α-^{32}P]dATP 或[α-^{32}P]dTTP
*Eco*R I	G CTTAA	[α-^{32}P]dATP
Hind III	A TTCGA	[α-^{32}P]dATP、[α-^{32}P]dGTP 或[α-^{32}P]dCTP
Nco I	C GGTAC	[α-^{32}P]dCTP、[α-^{32}P]dATP 或[α-^{32}P]dTTP
Not I	GC CGCCGG	[α-^{32}P]dGTP
Sal I	G CAGCT	[α-^{32}P]dTTP、[α-^{32}P]dCTP 或[α-^{32}P]dGTP
Xba I	T AGATC	[α-^{32}P]dCTP、[α-^{32}P]dTTP 或[α-^{32}P]dATP
Xho I	C GAGCT	[α-^{32}P]dTTP、[α-^{32}P]dCTP 或[α-^{32}P]dGTP

Materials

(1) dNTP 混合物

100 mmol/L dGTP	5 μL
100 mmol/L dCTP	5 μL
100 mmol/L dTTP	5 μL
双蒸水	85 μL

分装成 10~20 μL/管(因 dNTP 反复冻融易分解)，−20℃保存备用

(2) Klenow 大片段

(3) 10×添加缓冲液

(4) DNA (用 *Eco*R I 消化)

(5) [α-^{32}P]dATP (3000 Ci/mmol)

Protocols Time：1.5 h

ⓐ 按以下顺序添加：

双蒸水	___ μL (使总体积至 25 μL)
10×添加缓冲液	2.5 μL
dNTP 混合物	1 μL
DNA	___ μL(约 0.1~0.4 μg)
[α-^{32}P]dATP	2 μL
Klenow 大片段	___ μL (约 1 U)

↓

ⓑ 用微量移液器吸打混匀。

↓

ⓒ 30℃温育 15 min。

↓

ⓓ 75℃温育 10 min，使酶失活。

↓

ⓔ 用 Sephadex G-50 去除未反应物。

3. T4 DNA 聚合酶

与 Klenow 片段一样用于 3′ 端标记。但 T4 DNA 聚合酶的 3′→5′ 外切核酸酶活性比 Klenow 片段高，因此主要用于 3′ 黏性末端标记(图 13-4)。

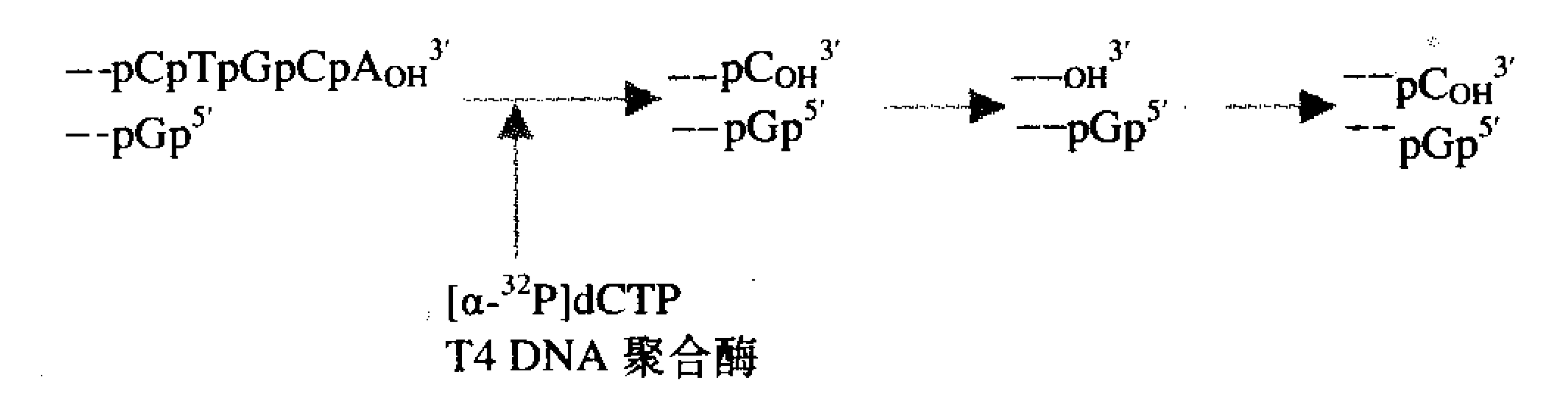


图 13-4　利用 T4 DNA 聚合酶标记 3′ 黏性末端

Materials

(1) dNTP 混合液

100 mmol/L dGTP	2 μL
100 mmol/L dCTP	2 μL
100 mmol/L dTTP	2 μL
双蒸水	85 μL

分装成每管 10~20 μL，−20℃保存

(2) T4 DNA 聚合酶

(3) 10×添加缓冲液

(4) DNA

(5) [α-^{32}P]dATP (3000 Ci/mmol)

Protocols　　Time：1.5 h

预调恒温水浴锅温度至 37℃、65℃

ⓐ 按以下顺序添加：

双蒸水	___ μL (使总体积至 25 μL)

10×添加缓冲液	2.5 μL
dNTP 混合物	1 μL
DNA	___ μL (约 0.1~0.4 μg)
[α-^{32}P]dATP	2 μL
T4 DNA 聚合酶	___ μL (约 1 U)

↓

ⓑ 用微量移液器吸打混匀。

↓

ⓒ 30℃保温 15 min。

↓

ⓓ 75℃保温 10 min，使酶失活。

↓

ⓔ 用 Sephadex G-50 去除未反应物。

4. 寡聚核苷酸探针

寡聚核苷酸广泛用于测序、杂交及引物外延。寡聚核苷酸的合成多由商家来完成，且多未在 5′ 端添加磷酸基团，因此很容易用 T4 PNK 来标记。

Materials

参考本章 T4 PNK 部分

Protocols　　Time：1.5 h

ⓐ 混合以下试剂：

双蒸水	__ μL (使总体积至 10 μL)
10×磷酸化缓冲液	1 μL
寡核苷酸	1 μL (5~10 pmol/L)
[γ-^{32}P]dATP	5 μL
T4 PNK	1 μL

↓

ⓑ 与本章 T4 PNK 完全相同[a]。

a. 使用 Sephadex G-25。

第四节　探 针 纯 化

探针制备后，用乙醇沉淀的方法可以部分去除未参与反应的核苷酸等物质，使用 Sephadex 等凝胶过滤方法可以除去所有未参与反应的核苷酸。根据核酸分子质量大小可以选择 Sephadex G-50(100bp 以上)或 Sephadex G-25(100bp 以下)。

Materials

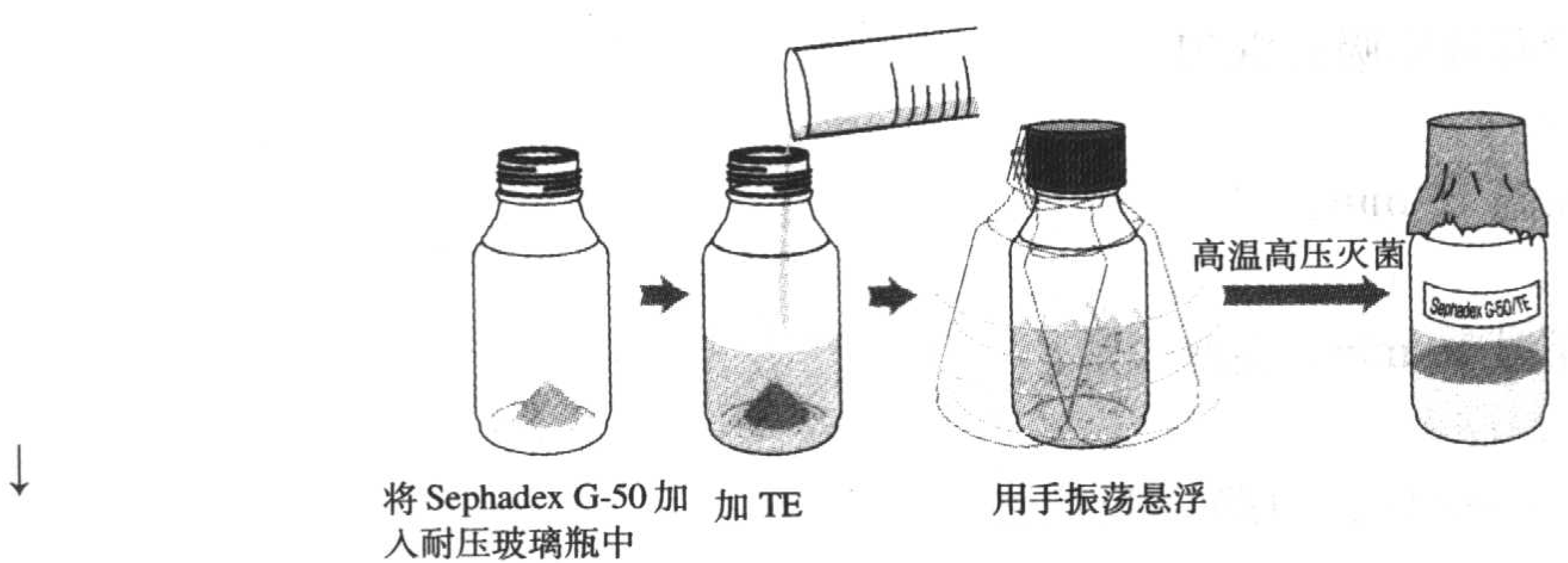
(1) 架子　　(2) 耐压玻璃瓶

(3) Sephadex G-50、G-25 (Amersham Pharmacia Biotech 公司)

(4) Poly-prep 层析柱(Bio-Rad 公司)

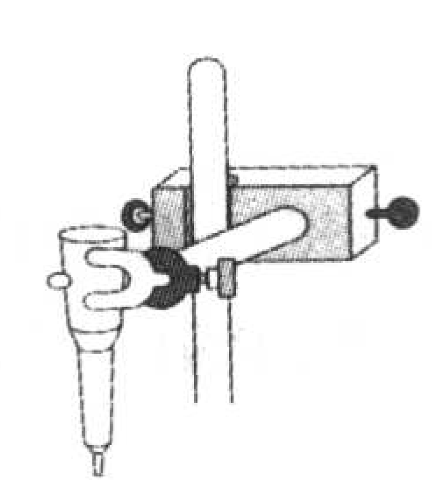
Protocols　　Time：1.5 h

ⓐ 将 Sephadex G-50 悬浮于 TE (若是 G -25，则悬浮于 $T_{50}E$)，并高压灭菌，室温保存备用。



↓

ⓑ 将 Poly-prep 柱置于架子上。



↓

ⓒ 将悬浮的 Sephadex 填充入柱中(下图为 1.5 mL 柱)。

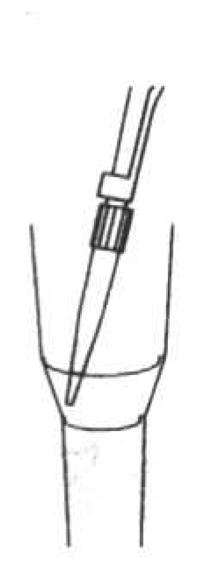


↓

ⓓ 用 5 mL TE (G-25 为 $T_{50}E$)进行平衡。

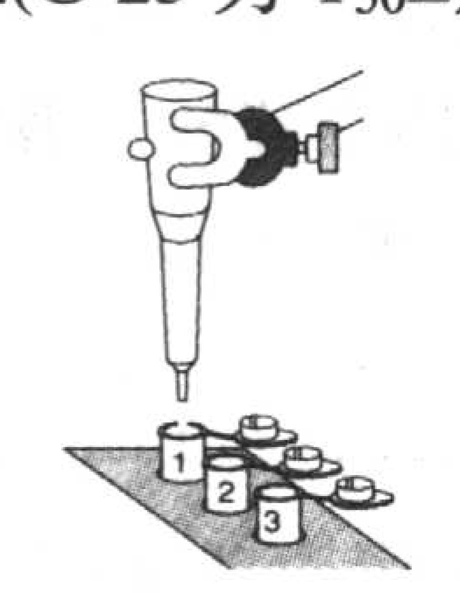
↓

ⓔ 将标记探针加入到柱中。



↓

ⓕ 缓慢加入 400 μL TE(G-25 为 $T_{50}E$)。

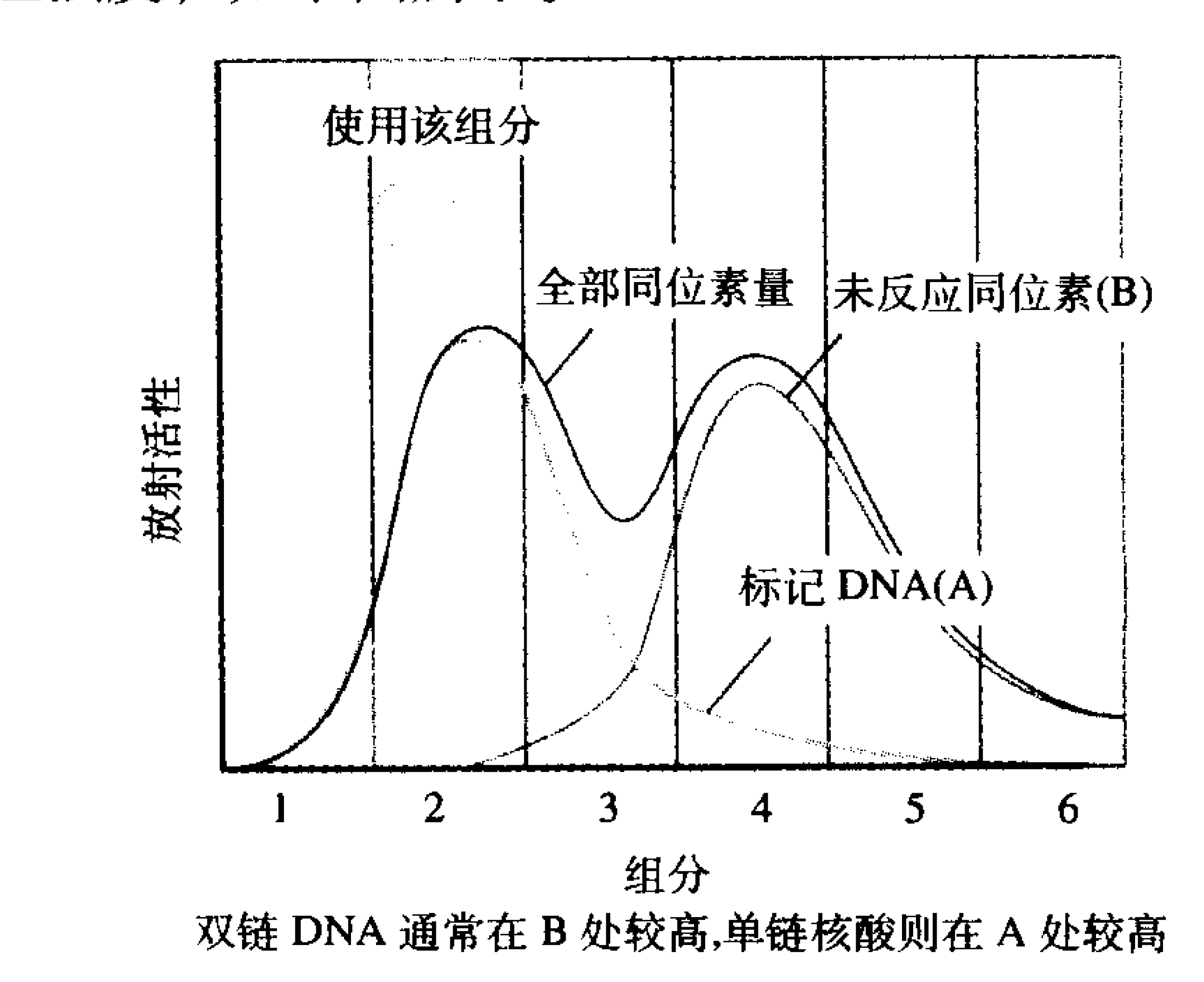


↓

ⓖ 回收 TE(G-25 为 $T_{50}E$)，每管 200 μL，
共回收 6 管。

↓

ⓗ 测定各组分的放射性强度，如下图所示。



双链 DNA 通常在 B 处较高,单链核酸则在 A 处较高

↓

ⓘ 选择放射活性高的组分为探针，进行杂交。

…Questions………………

1. 简述核酸探针标记的主要方法及其基本原理。
2. 末端标记探针的方法有哪几种？简述各自的原理。
3. 简述同位素操作中的注意事项。如何防止放射性污染？
4. 随机引物标记法为什么利用 Klenow 大片段或 T4 PNK 进行标记？
5. 为什么常用 ^{32}P 做同位素标记？
6. 简述探针纯化时的注意事项。

第十四章　PCR 产物克隆

第一节　PCR 产物重组策略

PCR 产物有 2 个特点，一是 5′ 端不带磷酸基团(除非引物经磷酸化处理)；二是 pol I 型酶扩增产物的 3′ 端可能冗余一个 A 碱基(图 14-1)。因此可采用图 14-2 所示的 3 种方法进行重组。

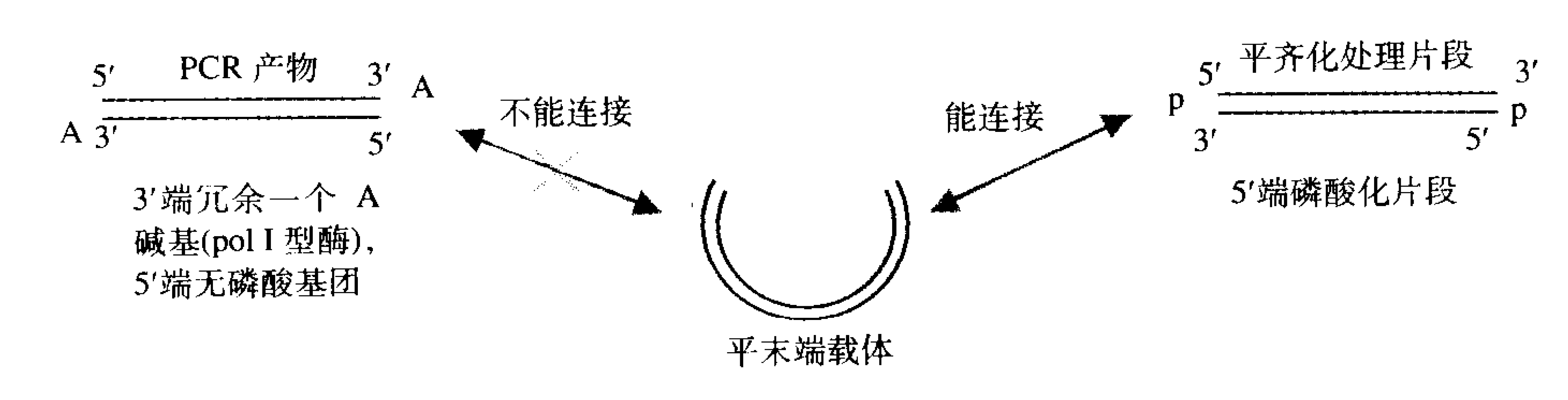


图 14-1　PCR 产物与载体连接

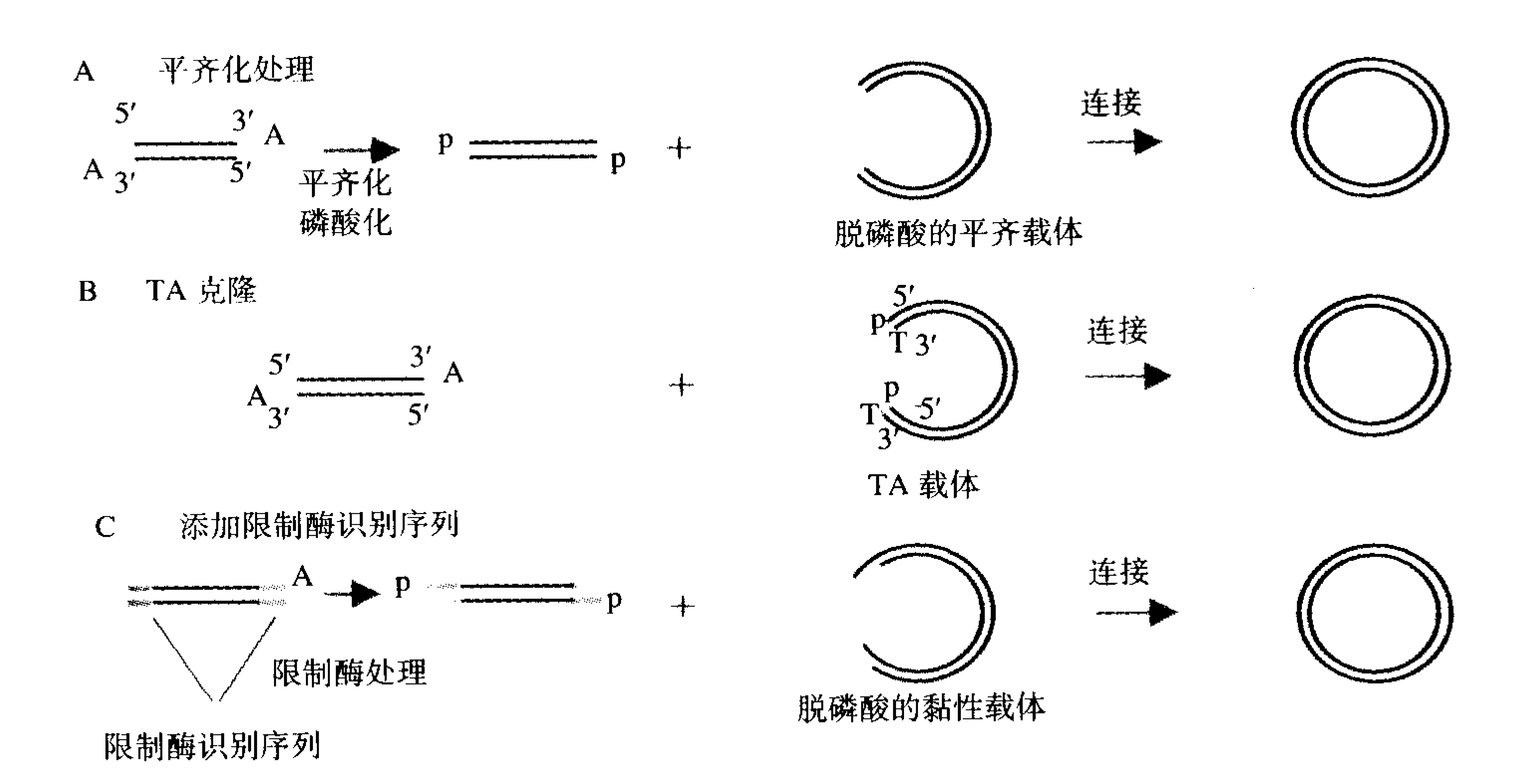


图 14-2　PCR 产物重组策略

第二节　PCR 产物的纯化

PCR 产物中含有 dNTP、未反应完毕的引物、耐热 DNA 聚合酶及非目的 DNA 等，这些成分将严重影响重组体的构建，如限制酶消化、与载体连接等。其中用 EB 染色后看不清或呈拖尾状的小分子 DNA，其摩尔数甚至比特异 DNA 还多，与载体的连接更具

优势，这将给筛选增加了很多麻烦，为此需要对 PCR 产物进行纯化。

1. 苯酚/氯仿/异戊醇抽提，乙醇沉淀

这是最简单的纯化操作，经该法纯化的产物中尚存有大量的引物二聚体、dNTP 和非目的 DNA 等。

2. 琼脂糖凝胶电泳

这是去除非目的 DNA 最有效的方法。目前市场上有各种凝胶回收试剂盒销售，但本实验室优先选择的是切胶冻融回收法及用 SIGMA 公司的 GenElute™ 琼脂糖旋转柱。

3. 滤膜过滤

将 PCR 产物过一定孔径的滤膜，某大小以下的 DNA 将被滤去而留下某大小以上的 DNA。利用该方法可将 dNTP、引物等小分子除去，但不能去除较大的非目的 DNA。

4. DNA 吸附柱吸附

用树脂或硅化膜吸附 PCR 产物中的 DNA，洗去其他杂质。该方法与滤膜过滤法类似，不能去除分子质量较大的非特异 DNA。

第三节 末 端 平 齐

TA 克隆技术尚未开发时，末端平齐处理是基因操作中广泛应用的一项技术。该技术先用 Klenow 大片段将 3′ 黏性末端平齐，再用 T4 多核苷酸激酶将 5′ 端磷酸化[a]。对于 α 型酶扩增产物，也许不必经平齐化处理，但 5′ 端磷酸化是必需的，这样可以省略随后操作中的ⓐ~ⓔ步。

a. 引物若经磷酸化处理过，其扩增产物不必再经磷酸化处理。

Materials

(1) 台式离心机
(2) 37℃恒温水浴锅
(3) 苯酚/氯仿/异戊醇(附录一)
(4) 预冷乙醇(100%、70%)
(5) 3 mol/L NaAc(pH 5.2) (附录一)
(6) PCR 产物
(7) Klenow 大片段
(8) 10×Klenow 添加缓冲液
(9) 2.5 mmol/L dNTP
(10) 10 mmol/L ATP
(11) T4 多核苷酸激酶
(12) 10×T4 多核苷酸激酶添加缓冲液
(13) DNA 连接相关试剂
(14) 大肠杆菌感受态细胞及转化相关试剂

Protocols　　Time: 酶处理 1.5 h　　连接 30 min 或过夜

ⓐ 对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳，回收并纯化目的带，回收的 DNA 溶于 40.5 μL 无菌水中。

↓

ⓑ 按以下体系配制 Klenow 大片段反应液：

回收 DNA	40.5 μL
10×Klenow 添加缓冲液	5 μL
2.5 mmol/L dNTP	4 μL
Klenow 大片段(4 U/μL)	0.5 μL
总体积	50 μL

↓

ⓒ 室温下保温 15 min，使之末端平齐。

↓

ⓓ 补加双蒸水至 100 μL，再添加等量苯酚/氯仿/异戊醇，然后用旋涡混合器充分混匀，室温下 15 000 r/min 离心 3 min。

↓

ⓔ 上清转移至新管，加 1/10 体积 3 mol/L NaAc 和 2.5 倍体积预冷 100%乙醇，4℃、15 000 r/min 离心 10 min，沉淀用 70%乙醇漂洗后，离心干燥。

↓

ⓕ 用 33.2 μL 无菌水溶解干燥的 DNA。

↓

ⓖ 按以下体系配制 T4 多核苷酸激酶反应液[b]：

回收 DNA	33.2 μL
10×T4 激酶添加缓冲液	4 μL
10 mmol/L ATP	0.8 μL
T4 多核苷酸激酶(10 U/μL)	2 μL
总体积	40 μL

b. 对于 100 bp 以上 DNA 片段，添加量应在 2 μg 以下，即 5′ 端量在 50 pmol 以下。

↓

ⓗ 37℃保温 30 min(磷酸化)。

↓

ⓘ 按ⓓ的苯酚/氯仿/异戊醇抽提、ⓔ的乙醇沉淀流程进行操作。

↓

ⓙ 用 2.5~5.0 μL 无菌水溶解干燥 DNA。

↓

ⓚ 取部分 DNA (约 1/5 体积)进行电泳，以确定回收量。

↓

ⓛ 按摩尔数 3：1~10：1 (回收 DNA：脱磷酸化的平末端载体)添加进连接体系中，进行连接反应。

↓

ⓜ 连接完成后，连接体转化进大肠杆菌。

第四节　TA 克　隆

在 pol I 型聚合酶介导的 PCR 扩增中，自动在扩增产物 3′端无模板添加一 A 碱基，产生一 3′A 黏性末端，该 PCR 产物与带有一 3′T 黏性末端的载体连接成重组子，该方法叫做 TA 克隆。TA 克隆方法提高了连接效率，也省去了 PCR 产物脱磷酸化步骤，因此是一个非常简便的方法。需要注意的是不能使用 *pfu* DNA 聚合酶等 α 型酶。

图 14-3 是制备 T 载体的流程图，反应体系中加入 *Taq* DNA 聚合酶，及一种脱氧核苷酸 dTTP，在平齐切割的线性质粒载体的 3′端上添加一个 T 碱基。

图 14-3　T 载体制备方法

1. T 载体制备

Materials

(1) 琼脂糖凝胶电泳装置
(2) 酚抽提和乙醇沉淀的相关器械和试剂
(3) 37℃恒温水浴锅
(4) 70℃恒温水浴锅
(5) 具有平齐切点的质粒(最好能进行蓝白筛选)
(6) 产生平齐切割的限制酶及相应添加缓冲液
(7) 凝胶回收 DNA 相关试剂
(8) 10 mmol/L dTTP
(9) *Taq* DNA 聚合酶及相应添加缓冲液
(10) DNA 连接酶及相应添加缓冲液
(11) 转化所需感受态细胞及相关试剂

Protocols　Time: 消化 2 h 或过夜　电泳回收 1~3 h　*Taq* 聚合酶处理 3 h

ⓐ 用产生平末端的限制酶消化 5~10 μg 载体 DNA。

↓ O/N

ⓑ 电泳检测切割情况 [a]，并回收线性带。

↓

ⓒ 回收的 DNA 溶于 100~400 μL 双蒸水中，加等量苯酚/氯仿/异戊醇后，用旋涡混合器充分混匀，室温下 15 000 r/min 离心。

↓

ⓓ 离心后上清转入新管，加 1/10 体积 3 mol/L NaAc 和 2.5 倍体积预冷乙醇，4℃、15 000 r/min 离心 5~10 min。离心后用 70%乙醇漂洗沉淀，用离心干燥机使沉淀干燥。

↓

ⓔ 干燥的线性 DNA 溶于 79 μL 无菌水中。

↓

a. 该步可以省略，但即使电泳中仅显示出唯一一条带，也不能排除存在微量的未消化的环状 DNA。这些环状质粒 DNA 将严重影响转化的背景，因此尽可能采用凝胶回收方式对线性 DNA 进行纯化。

ⓕ 按以下体系配制 *Taq* DNA 聚合酶反应液：

线性质粒	79 μL
10×*Taq* DNA 聚合酶添加缓冲液	10 μL
10 mmol/L dTTP	10 μL
Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)	1 μL
总体积	100 μL

↓

ⓖ 在反应液表面铺一层石蜡油，70℃温育 2 h。

↓

ⓗ 加 100 μL 苯酚/氯仿/异戊醇，混匀后，室温下 15 000 r/min 离心 3 min。

↓

ⓘ 上清转入新管，再进行一次苯酚/氯仿/异戊醇抽提。

↓

ⓙ 上清转入新管，加 1/10 体积 3 mol/L NaAc 和等体积异丙醇，4℃、15 000 r/min 离心 5~10 min。弃上清。用 70%乙醇漂洗沉淀。用离心干燥机使沉淀干燥[b]。

b. 相对乙醇沉淀而言，异丙醇沉淀更能抑制 dTTP 的混入。

↓

ⓚ 干燥的 DNA 片段溶于 50 μL 无菌水中。

↓

ⓛ 取少量(0.5~1 μL)电泳以确定回收量。

↓

ⓜ 稀释成 20~50 μg/μL，分装成每管 10 μL[c]，−20℃保存，备用。

c. 反复冻融容易丢失添加的 T 尾，因此尽量分成小包装保存。

↓

ⓝ 载体自连、转化，确定其自连背景[d]。

d. 事先了解制备载体的质量是必需的。

2. 利用 T 载体进行重组

Materials

(1) 琼脂糖凝胶电泳相关器械和试剂

(2) 酚抽提、乙醇沉淀相关器械和试剂

(3) 转化相关器械和试剂

(4) DNA 连接相关器械和试剂

(5) 纯化的 PCR 产物

Protocols　　Time：30min 或过夜

ⓐ PCR 产物电泳，回收并纯化目的 DNA 带。

↓

ⓑ DNA 沉淀溶于 5~10 μL 双蒸水中，取少量(1/10~1/5)电泳确定回收量。

↓

ⓒ 在 20~50 ng T 载体中添加 3~10 倍(摩尔比)回收的 DNA 片段以进行连接。

↓

ⓓ 连接后，转化进大肠杆菌。

↓

ⓔ 转化菌铺于含 X-gal 及 IPTG 的 LA 平板上，筛选白色菌落[a]。

a. 如插入 DNA 片段较短(<500 bp)，未能改变 *lac* 基因的可读框，那么即使含有插入片段的重组体也是蓝色的，这点应特别注意。



…Tips………………

TA 克隆常见问题分析及其解决方案

现象	可能原因	解决方法
转化后无克隆产生	转化失败或感受态细胞失活	做转化对照，保证感受态细胞的效率
插入对照 DNA 片段的阳性率低	连接反应效率低	连接缓冲液只有低的活性。10×快速连接缓冲液含有 ATP，温度波动 ATP 易降解，使用一次性分装的缓冲液，避免其反复冻化
	T 突出端丢失	避免外切核酸酶的引入，降解 T 突出端。只使用无外源核酸酶的 T4 连接酶
	连接温度太高	连接温度过高(>28℃)会使背景增加，使重组克隆菌减少。降低连接温度可以提高白斑率
PCR 产物连接时白色菌落数很少或根本没有	PCR 产物中含有抑制连接的成分	将 PCR 产物和连接反应对照混合，观察是否存在抑制反应。如怀疑有抑制成分存在，应重新纯化 PCR 产物
	PCR 产物没有 3′ A 突出端，不能连接	并非所有 DNA 聚合酶都产生 3′ A 突出端，如 *Pfu* 酶的 PCR 产物为平端，平端PCR 产物可先通过聚合酶及 dATP 进行加尾反应产生 3′ A 突出端，再与 T 载体连接
	PCR 产物存在嘧啶二聚体，不能连接	尽量缩短 DNA 在紫外灯下照射的时间，尽量使用长波长紫外光源观察 PCR 产物
	PCR 产物已经插入，但未破坏 *lacZ* 基因的翻译框	一般插入片段较短(小于 100 bp)时，插入片段可能没有影响 *lacZ* 基因的可读框时，蓝色菌落可能含有插入片段
	插入片段与载体连接比例不理想	凝胶电泳检测 PCR 产物的完整性及浓度，优化插入片段与载体的比例
	连接的 PCR 片段中可能有引物二聚体	引物二聚体可连接到 TA 载体中，因为它们很小，所以酶切消化后电泳检测看不到带，看起来载体中没有插入。和背景对照相比，连接产物较多蓝色克隆。PCR 产物需要重新凝胶纯化
PCR 连接反应只产生白色克隆	氨苄失活，因而氨苄敏感菌可生长	检查氨苄平板是否正确制备并在 1 个月内使用
	平板不适合蓝白斑筛选	检测背景对照，如果克隆菌不是蓝色的，检查平板是否含有氨苄/IPTG/X-gal、是否新鲜。如平板有问题，重新制备新鲜平板
含有目的 PCR 产物的克隆菌数不够	PCR 片段很多没有 A 尾	将 PCR 产物纯化后进行加尾反应。样品纯化后进行连接反应
	插入片段：载体比例不理想	凝胶电泳检测 PCR 产物的完整性及产量，优化插入片段

第五节　添加限制性内切核酸酶识别序列

是制作重组 DNA 的常用 PCR 方法，为此需要在引物 5′ 端添加限制酶识别序列，因此 PCR 产物将比模板多了限制酶识别序列(图 14-4)。再用限制酶消化该 PCR 产物，将产生出黏性末端，与用相同限制酶消化的载体连接，就很容易实现重组。

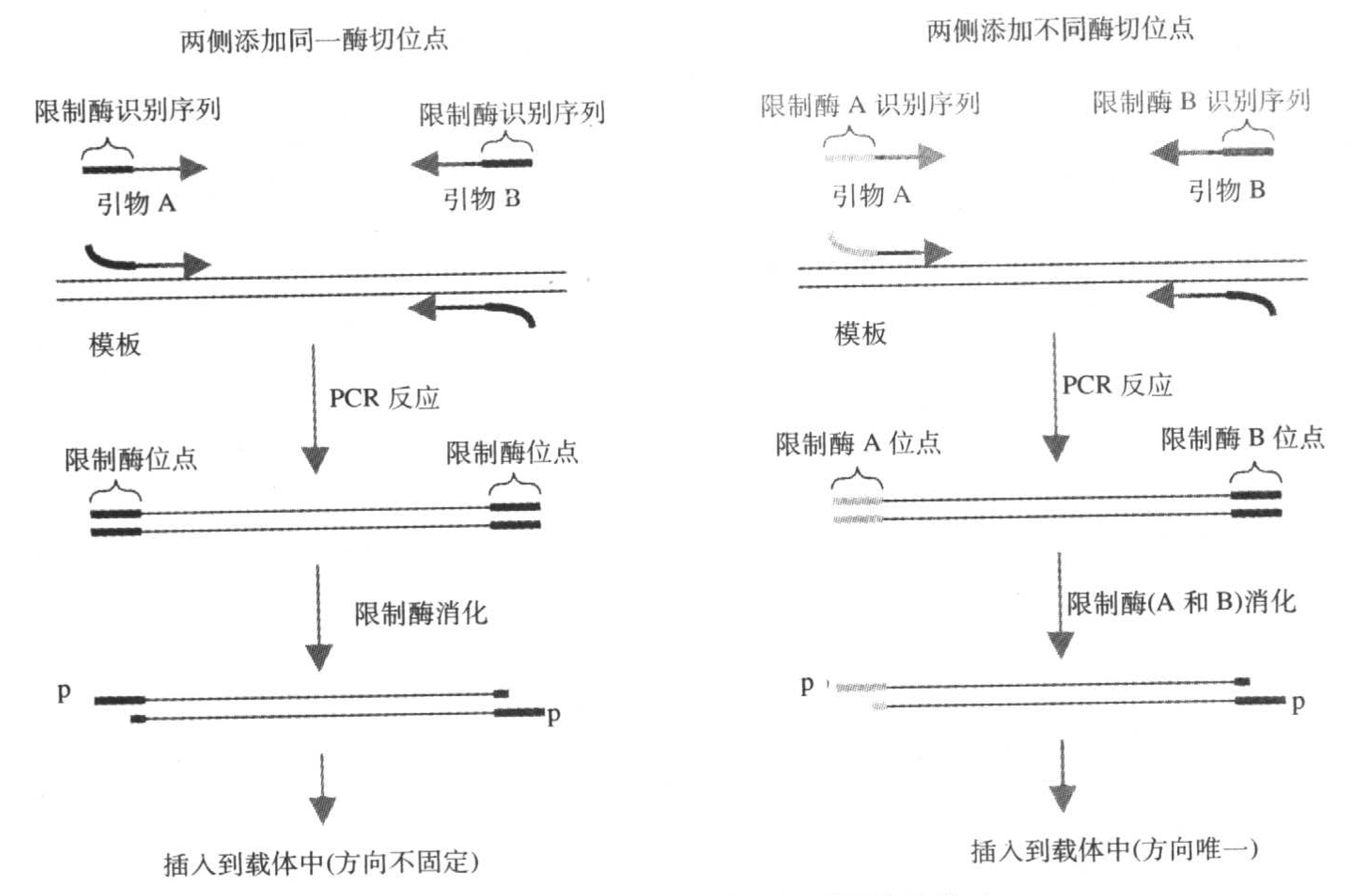


图 14-4　通过 PCR 引物引入限制酶位点

1. 引物设计

假设引物内与目的 DNA 配对的序列为 3′ 端的 18 个碱基，则 5′ 端可添加 6 个碱基的限制性内切核酸酶识别序列，且该 6 个碱基序列应是目的 DNA 中不存在的。酶切后产生的 5′ 黏性末端或 3′ 黏性末端将大大提高连接效率。

除了限制酶识别序列外，还应在限制酶识别序列外侧再多加二三个碱基，以保证酶切的有效进行，该序列叫保护碱基(图 14-5，附录四)。

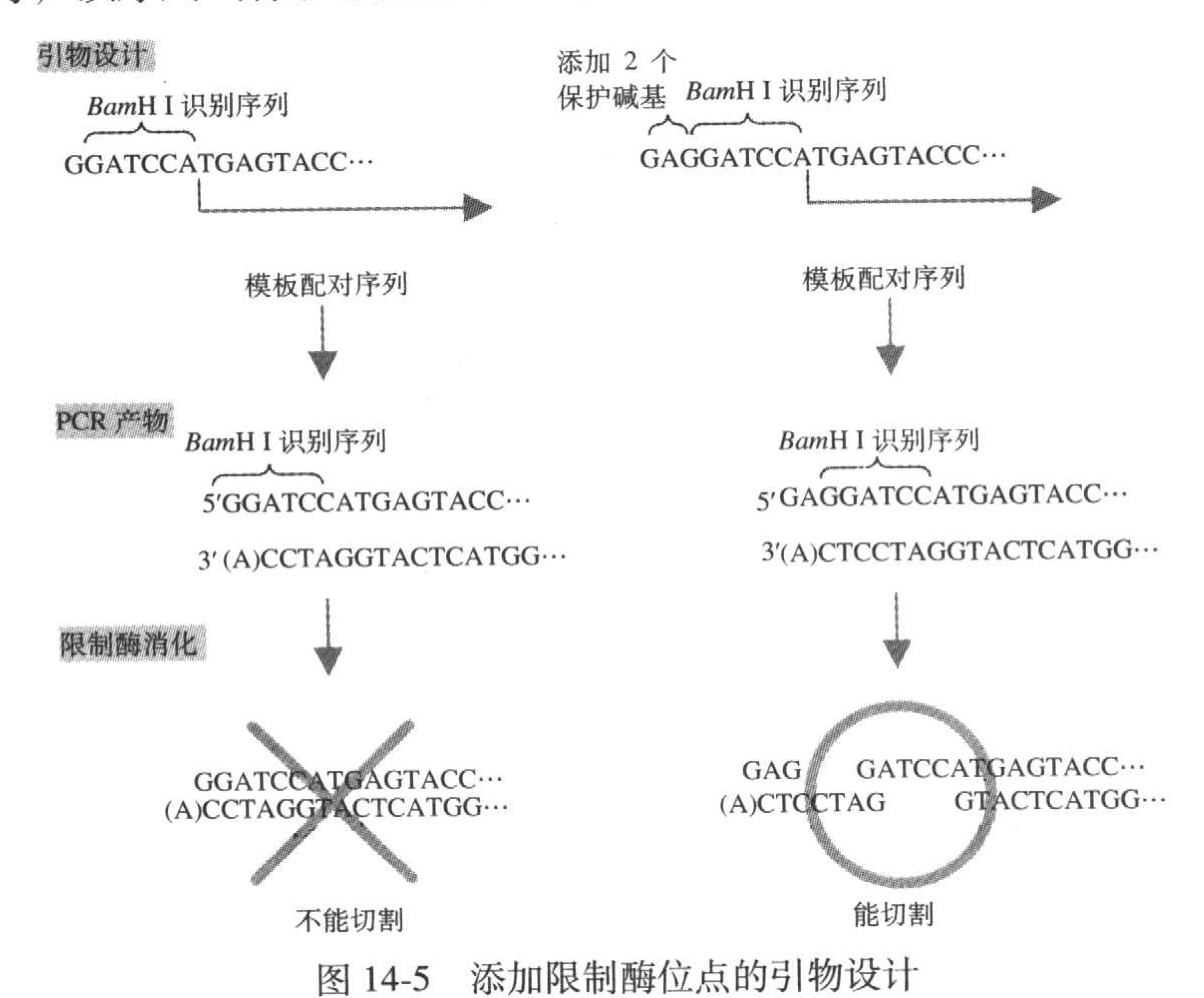


图 14-5　添加限制酶位点的引物设计

2. 利用限制性内切核酸酶位点进行重组

Materials

(1) 37℃恒温水浴锅
(2) 琼脂糖凝胶电泳相关设备和试剂
(3) 酚抽提、乙醇沉淀相关设备和试剂
(4) 连接设备和试剂
(5) 转化相关设备和试剂
(6) 质粒
(7) PCR 产物
(8) 限制性内切核酸酶及 10×添加缓冲液

Protocols Time: 酚抽提、乙醇沉淀 1 h，酶切 2~3 h，回收 1~3 h，连接 30 min 至过夜

ⓐ 将 PCR 产物转移至 1.5 mL Eppendorf 管中，加水至 100~400 μL 后进行苯酚/氯仿/异戊醇抽提。

↓

ⓑ 上清转入新管，加 1/10 体积 3 mol/L NaAc 和 2.5 倍体积预冷 100%乙醇，4℃、15 000 r/min 离心 5~10 min，沉淀用 70%乙醇漂洗后干燥。

↓

ⓒ 回收的 PCR 产物及载体用限制性内切核酸酶消化。

↓

ⓓ 电泳回收限制性内切核酸酶目的带，用苯酚/氯仿/异戊醇抽提，乙醇沉淀，并干燥。

↓

ⓔ 载体 DNA 脱磷酸化处理，苯酚/氯仿/异戊醇抽提，乙醇沉淀，并干燥。

↓

ⓕ 加适量双蒸水溶解沉淀，并取少量(1/10~1/5)电泳以确定回收量。

↓

ⓖ 按摩尔比 1 (载体)：3~10 (PCR 片段)比例进行连接。

↓

ⓗ 连接后转化大肠杆菌。

…Questions………………

1. 简述 PCR 产物的克隆策略。如何根据 PCR 产物的末端结构选择不同的克隆策略？
2. PCR 产物中常常混有哪些 DNA 成分？如何从中纯化出你所需要的目的 DNA？
3. 简述 TA 克隆的基本原理。TA 克隆策略在 PCR 产物的克隆上有什么特别价值？
4. 什么是 T 载体？如何制备 T 载体？
5. 在你所设计的 PCR 产物克隆方案中，哪些可以借助蓝白实验筛选重组子？
6. 什么是保护碱基？在引物设计时，如何利用它来实现 PCR 产物的克隆？

第十五章　PCR 应用

PCR 技术广泛应用于基因操作中，如菌落 PCR 和简并引物 PCR 就使用了 PCR 技术。本章主要介绍菌落 PCR 和简并引物 PCR 的原理和注意事项，详细的实验流程请根据具体情况自行确定。

第一节　菌落 PCR

DNA 重组所得菌落不必经质粒提取也可直接进行 PCR，以确定重组体中是否含有需要的目的 DNA。所用引物可以是载体多克隆位点两侧序列(图 15-1A)，但这样的检测可能造成误判，因为可能存在插入片段大小相同的非目的 DNA。为此，应以目的 DNA 序列设计一引物，连同载体序列引物一起进行 PCR，以增加检测的特异性，确定重组方向。

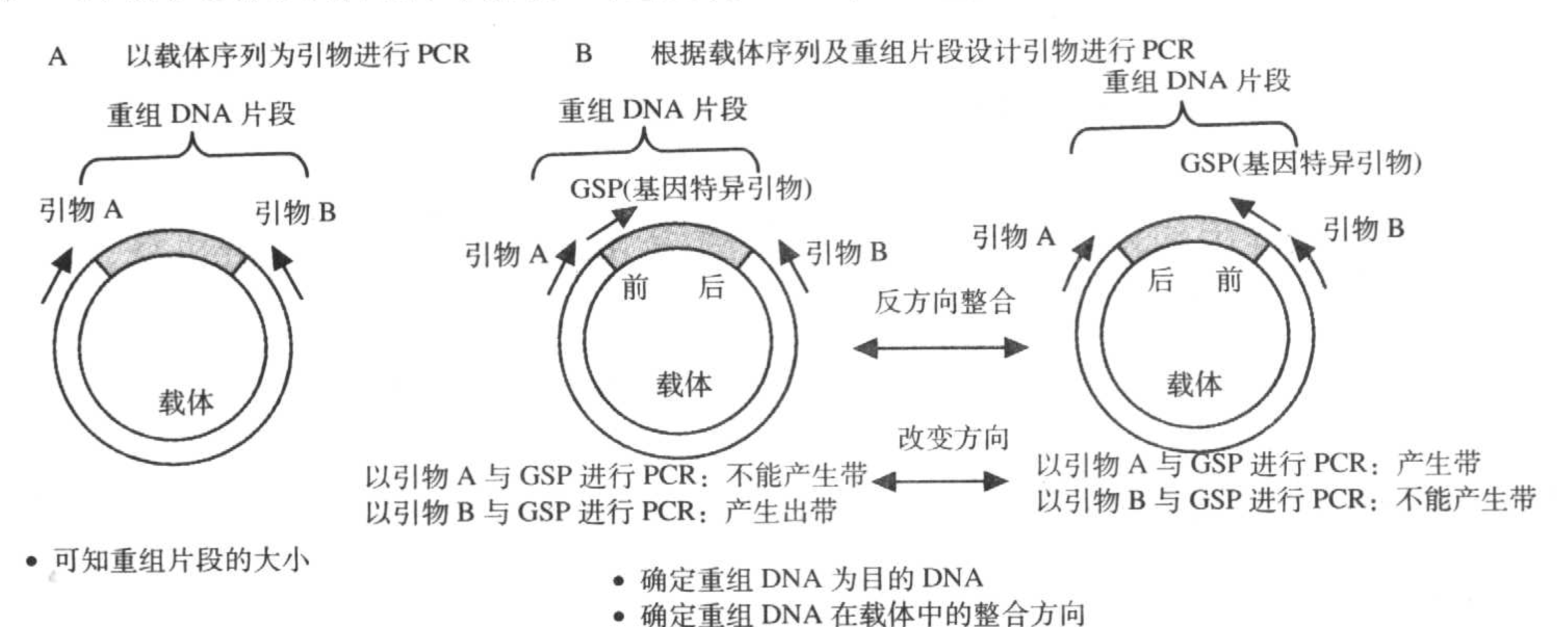


图 15-1　菌落 PCR 所用引物的搭配

Materials

(1) LA 平板
(2) PCR 管
(3) 无菌牙签
(4) PCR 仪(MJ Research PTC-200)
(5) PCR 相关试剂

Protocols　　Time：菌落处理 30 min　PCR 3 h

ⓐ 准备一个平板，皿底的反面上粘贴画有方格和号码的纸[a]。

↓

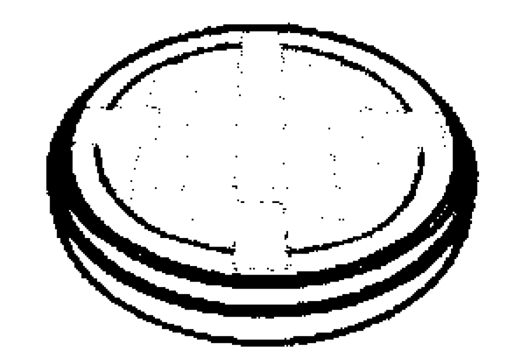
ⓑ 准备一些干净的 1.5 mL Eppendorf 管，标记号码后，加 50~100 μL 无菌水。

↓

a. 复印划有方格和标记号的纸(附录五)，粘贴在培养皿底面。

ⓒ 用牙签挑少许菌落。

↓



ⓓ 将黏菌的牙签插进 1.5 mL Eppendorf 管水中，使大肠杆菌悬浮。

↓

ⓔ 将同一牙签插到平板上的培养基中特定位置(粘有标记纸的某一格中)，记录编号。

↓

ⓕ 所有待测菌落处理完毕后，将平板倒置于 37℃培养箱中，过夜培养。

↓

ⓖ 将 1.5 mL Eppendorf 管于 98℃加热 3 min 后冷至室温，15 000 r/min 离心 1 min。

↓

ⓗ 取数微升上清作为 PCR 模板进行 PCR，确定目的菌落号。



1. 应用 PCR 技术快速筛选菌落方法(一)

ⓐ 溶液配制：

TTE 溶液：

Triton X-100	0.25 mL
1 mol/L Tris · HCl (pH8.0)	0.5 mL
0.5 mol/L EDTA (pH8.0)	0.1 mL
用双蒸水定容至	25 mL

灭菌后分装于 1.5 mL Eppendorf 管中，储存于 4℃，备用

↓

ⓑ 取 1.5 mL Eppendorf 管数个，在每管中加入 50 μL TTE 溶液。用新牙签(或接种环)挑取隔离良好的菌落，或 2 μL 过夜液体培养物，悬浮于其中。

↓

ⓒ 95~100℃ 保温 5~10 min，以裂解菌体。

↓

ⓓ 室温、15 000 r/min 离心 5 min，取 1 μL 上清进行 PCR 检测。

10×PCR 缓冲液	2 μL
dNTP(各 2.5 mmol/L)	1.6 μL
引物 1 (10 μmol/L)	0.6 μL
引物 2 (10 μmol/L)	0.6 μL
Taq DNA 聚合酶	0.5 U
用双蒸水定容至	20 μL

↓

ⓔ 取 10 μL 扩增产物进行电泳分析。

↓

ⓕ 保存阳性菌落或进一步实验。

2. 应用 PCR 技术快速筛选菌落方法(二)

ⓐ 用新牙签(或接种环)挑取隔离良好的菌落，或 2 μL 过夜液体培养物至 10 μL 双蒸水中。

↓

ⓑ 95~100℃保温 5~10 min，以裂解菌体。

↓

ⓒ 室温、15 000 r/min 离心 5 min 后，取上清进行 PCR 检测。

↓

ⓓ 取 10 μL 扩增产物进行电泳分析。

↓

ⓔ 保存阳性菌落或进一步实验。

第二节 简并引物 PCR

根据蛋白质的氨基酸序列设计引物进行的 PCR 叫简并引物 PCR。由于其 DNA 序列未知，仅掌握氨基酸的序列信息，此时可考虑设计简并引物进行 PCR 来达到分离目的基因的目的。因为蛋白质编码有简并性，同一个氨基酸有几个密码子，因此设计与氨基酸对应的 DNA 引物时需要考虑其多种可能性(图 15-2)。

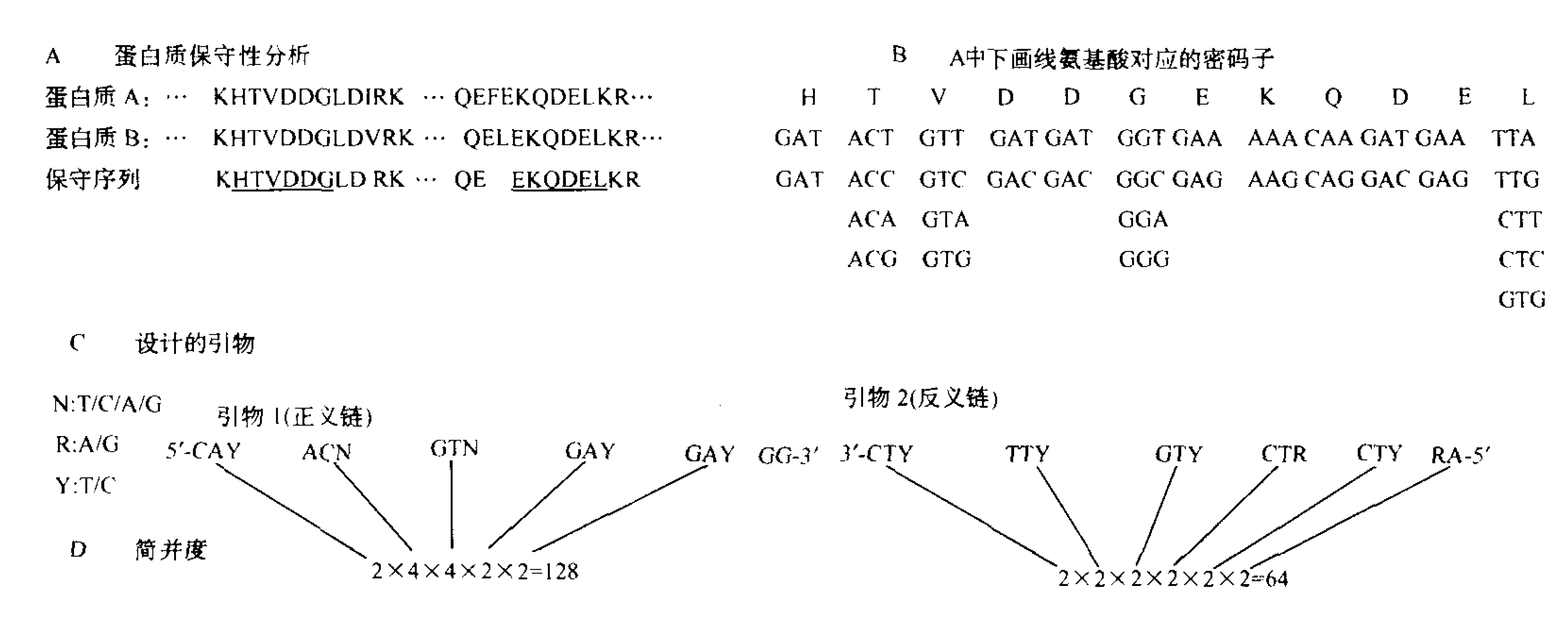


图 15-2 简并引物设计实例

1. 简并度应尽量小

简并引物的种类越多，每种特异序列引物的浓度就越低，非特异配对序列的概率就越高。因此，控制简并度是 PCR 成功的关键。一般而言，应在 256 以下，最大也应控制在 512 以内。

2. 扩增长度

扩增长度不宜过长，应控制在 100~500 bp 范围。

3. 引物浓度

由于简并引物是混合物，每种引物浓度相应较低，因此应提高加入到反应体系中简并引物的总浓度。通常简并引物的浓度是普通 PCR 引物的 10 倍，即终浓度为 5 μmol/L。

4. RT-PCR 模板

常用 oligo(dT)或随机引物的逆转录产物为模板，但 RNA 最好用 poly(A)$^+$ mRNA。

5. 可以在一侧添加附加碱基

在以 cDNA 库或 RACE 的 cDNA 为模板时，尽量不要用 2 个引物均为简并引物来进行扩增，可以考虑在一侧添加附加碱基，以此序列设计新引物进行 PCR。

6. 分离基因的鉴定

鉴定简并引物所扩增片段是否为目的基因是非常必要的，可以考虑用探针杂交来筛选。

···Questions···············

1. 在基因操作实验中，哪些步骤中要用到菌落 PCR？
2. 如何设计出理想的菌落 PCR 引物？菌落 PCR 中的 PCR 反应条件与常用的 PCR 反应条件相比有哪些区别？
3. 菌落 PCR 实验中，如何控制假阳性和假阴性现象的产生？
4. 试分析导致菌落 PCR 失败的主要原因。如何改进这些不足？
5. 什么叫简并度？在设计简并引物时，如何利用简并度？
6. 除了本章两种技术外，在基因操作中还有哪些常用的以 PCR 技术为基础的应用技术？

第十六章　Southern 印迹

Southern 印迹是分析基因结构或检测待分析 DNA 中是否含有特定序列的有效技术之一，1975 年由 E. M. Southern 首创，取其姓氏而命名[a]。用合适的限制性内切核酸酶消化待分析 DNA，然后电泳分离，电泳后的凝胶浸于碱性溶液中以变性 DNA，再通过毛细管现象将变性 DNA 从凝胶中转移到杂交膜上并固定，然后与放射性同位素标记的核酸探针杂交，再经过放射自显影显示杂交结果(图 16-1)。

a. DNA 转移到杂交膜上的技术为 Southern 印迹，与之相对应的 RNA 转移技术取名为 Northern 印迹。此外，将蛋白质转移到杂交膜上的技术称为 Western 印迹。

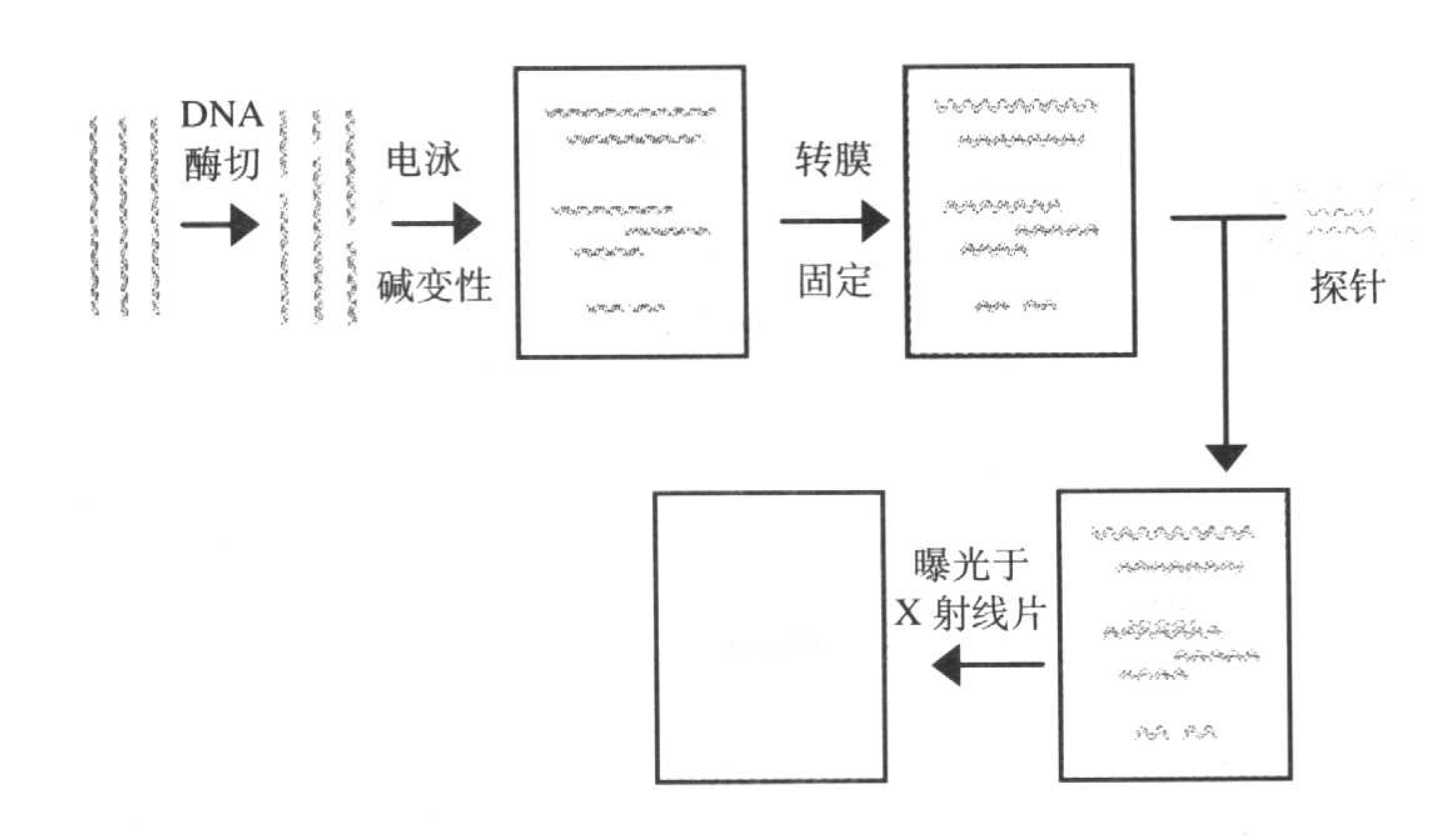


图 16-1　Southern 印迹原理

Southern 印迹适用于基因组中特异 DNA 的结构分析、基因多态性标记、转基因鉴定等领域。

第一节　DNA 酶切

哺乳类动物基因组 DNA 大小为 3×10^9 bp，限制性内切核酸酶消化后将产生一定大小的 DNA 片段。在基因结构分析中，常用几种酶对基因组进行切割。若酶切不彻底，电泳将产生拖尾现象，产生若干个杂交带，因此，充分酶切是非常重要的。酶切不彻底往往是由于提取基因组 DNA 的纯度不够高所致。

Materials

(1) 旋涡混合器
(2) 台式离心机
(3) 37℃恒温水浴锅
(4) 限制性内切核酸酶(由于需要较多的单位数，建议购买 30~200 U/μL 高浓度产品)
(5) 10×酶切缓冲液

(6) 3 mol/L NaAc(pH5.2)(附录一)　　(8) 预冷 100%乙醇、70%乙醇
(7) 苯酚/氯仿/异戊醇(附录一)

Protocols　　Time：8~16 h

ⓐ 10 μg 基因组 DNA 按以下反应体系：

基因组 DNA[a]	10 μg[b]
10×酶切缓冲液	40 μL
10×BSA 或 10×Triton X-100	40 μL[c]
限制性内切核酸酶	100~1000U

用无菌双蒸水定容到 400 μL[d]

↓

ⓑ 在最适温度下消化 8 h 以上或过夜。

↓ O/N

ⓒ 加 400 μL 苯酚/氯仿/异戊醇，用旋涡混合器搅拌均匀[e]。

↓

ⓓ 室温、15 000 r/min 离心 5 min。

↓

ⓔ 上清转入到 Eppendorf 管，重复ⓒ~ⓓ步操作。

↓

ⓕ 上清加 40 μL 3mol/L NaAc 和 1 mL 预冷 100%乙醇，混匀，4℃、15 000 r/min 离心 20 min[f]。

↓

ⓖ 弃乙醇，沉淀中添加预冷 70%乙醇后混匀，4℃、15 000 r/min 离心 5 min。

↓

ⓗ 弃乙醇，用干燥离心机风干沉淀，沉淀溶于 10 μL 无菌水或 TE 中。

a. 哺乳类基因组 DNA 黏度高，溶解不均匀，难以定量。小口径枪尖易剪断基因组 DNA，因此用于吸取基因组 DNA 溶液的枪尖应用剪刀将其顶尖剪掉。
b. Southern 印迹中产生明显杂交带的合适 DNA 量为 5~15 μg。
c. 有些酶切体系中需要 BSA 或 Triton X-100，注意不要忘记添加。
d. 最小的酶切反应体系是 DNA(μg)×10 μL，但为了彻底酶解，应大于此体积。可根据乙醇沉淀所允许的最大装载量(Eppendorf 管的体积为 1.5 mL，去除 1 mL 乙醇和 40 μL NaAc 的体积，故最大装载量约 400 μL)来制定反应体系。
e. 尚未进行酶切操作的基因组 DNA 或尚未使用过的限制性内切核酸酶，应电泳检测酶切是否完全。酚抽提前取少量酶切产物进行电泳检测，电泳检测应设阳性对照。
f. 确认沉淀是否产生。

第二节　琼脂糖凝胶电泳

在电泳中，DNA 按分子大小分离。如果电泳图谱零乱，则不能正确判定基因组 DNA 酶切片段的大小，这样的凝胶用于转膜，杂交图谱或者不清晰，或者条带紊乱，将得出错误的结果。因此，漂亮的电泳图谱是完成 Southern 印迹的重要一步。

Materials

(1) 凝胶成型装置[a]
(2) 电泳槽
(3) 紫外灯
(4) 点样缓冲液
(5) 琼脂糖
(6) TAE(附录一)
(7) EB(附录一)

a. 若想获得好的分离效果，宜使用较长的凝胶成型装置。常用 13 cm 长，配以 5 mm 宽梳子的凝胶成型装置。

ⓐ 配制 0.8%琼脂糖凝胶[b]。

↓

ⓑ 在电泳槽中加满 1×TAE 缓冲液。装有凝胶的成型装置放入后再拔梳子。

↓

ⓒ 在 10 μL DNA 样品中加入 2 μL 6×DNA 点样缓冲液。

↓

ⓓ 用微量移液器将样品加到凝胶孔中[c]。

↓

ⓔ 60 V 恒压电泳 6~8 h[d]。

↓ O/N

ⓕ 待溴酚蓝跑到 2/3 位置处停止电泳。

↓

ⓖ 电泳完毕后，将凝胶移入 EB 溶液(约 100 mL 水中加 1 μL 10 mg/mL EB 溶液)，染色 30 min。

↓

ⓗ 紫外灯下观察凝胶，照相。为了确认分子质量，在凝胶侧面做一标记[e]，并冲洗出与凝胶大小相同的照片。

b. 常用琼脂糖凝胶浓度为 0.8%~1.0%，厚度为 6~7 mm。薄的凝胶容易进行 EB 染色和转膜。

c. 相对分子质量标准物应点在最左端孔中。市场上有 1 kb 间距的相对分子质量标准物出售，非常便于分子质量的计算。

d. 高电压(100 V 以上)电泳图谱将非常杂乱，20~30 V 过夜电泳则很少杂乱。

e. 酶切完全的 DNA 应是严重拖尾的电泳图谱，且出现限制性内切核酸酶特有的卫星条带[f]。若在高分子质量位置出现明显条带，则是酶切不彻底导致的。若不酶切也出现拖尾现象，则是由 DNA 提取过程中的剪切所致。

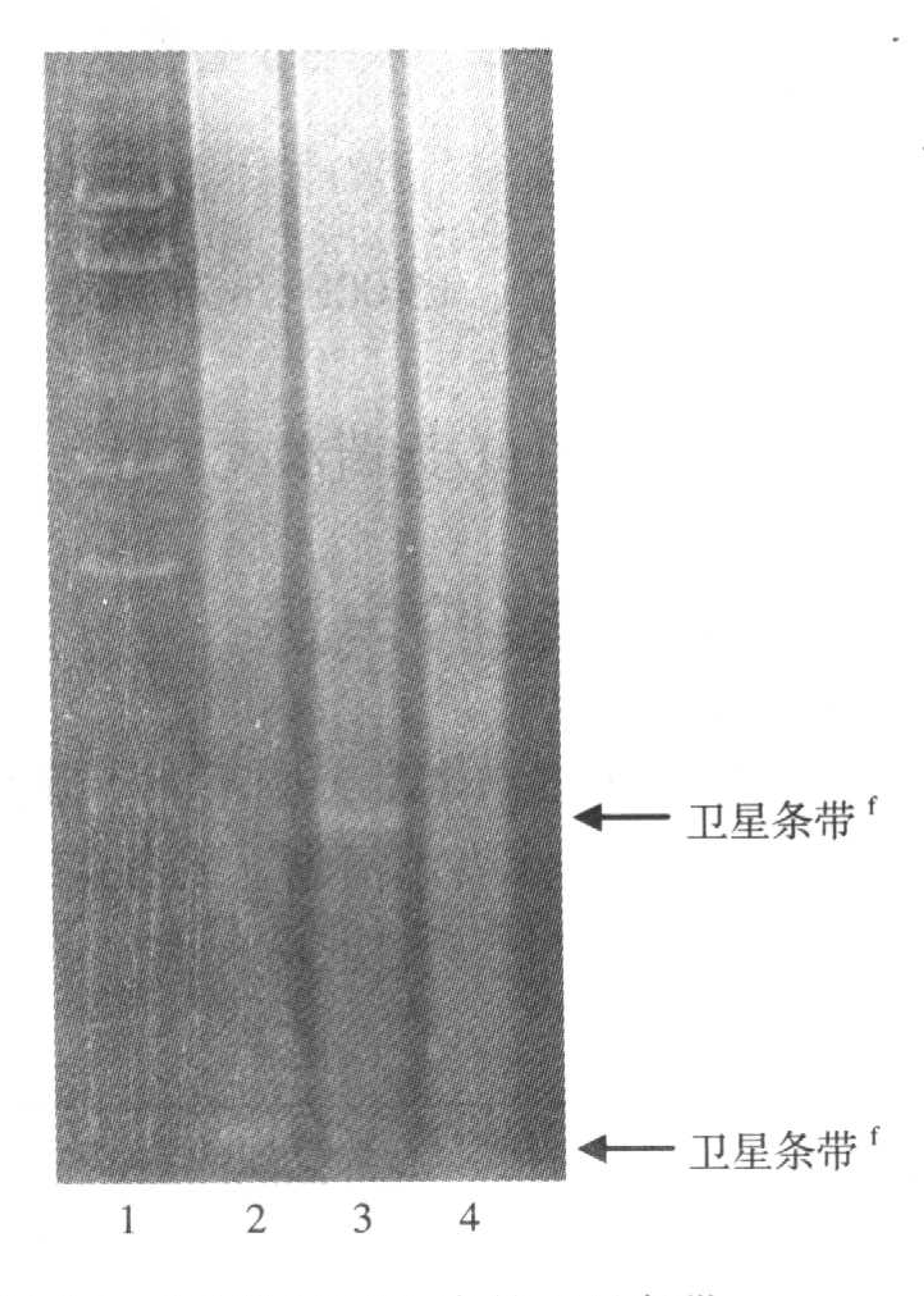


图 16-2 基因组 DNA 中的卫星条带

1. λ/*Sty* I 相对分子质量标准物；2. *Bam*H I 酶切 10 μg 鼠基因组 DNA；3. *Eco*R I 酶切 10 μg 鼠基因组 DNA；4. *Hin*d III 酶切 10 μg 鼠基因组 DNA

f. 哺乳类动物 DNA 中存在大量重复序列，叫做卫星 DNA。若该重复 DNA 中含有酶切识别序列，将产生大小一致的 DNA 条带。这些长度一致的条带数量多，则出现亮度更明显的区带，这些区带叫做卫星条带(图 16-2)。

第三节　变性、转膜与固定

电泳分离的 DNA、RNA、蛋白质等转移到杂交膜上，并被固定起来的过程叫做印迹(blotting)。DNA 转膜叫 Southern 印迹。转膜前必须对双链 DNA 进行变性处理。

高分子质量 DNA 转膜困难，因此，在与低分子质量 DNA 一起转膜时，会出现转膜不同步的现象。为此，需用盐酸浸泡凝胶，使高分子质量 DNA 降解成小分子质量片段，以提高高分子质量 DNA 的转膜效率。

1. 利用毛细管原理进行转膜

Materials

(1) 尼龙膜或硝酸纤维素膜(Hybond-N^+, Amersham Pharmacia Biotech 公司)

(2) 3 MM 滤纸

(3) 吸水纸

(4) 一次性手套

(5) 转膜装置

(6) 水解液

0.25 mol/L HCl

(7) 变性液

1.5 mol/L NaOH、0.5 mol/L NaCl

(8) 中和液

1.5 mol/L NaCl、0.5 mol/L Tris · HCl (pH7.2)、10 mmol/L EDTA

(9) 0.4 mol/L NaOH [a]

(10) 转膜缓冲液

20×SSC (附录一)

a. 尼龙膜经碱处理后，增加与核酸的结合能力。

Protocols　　Time：6~18 h

ⓐ 凝胶照相后，剥离下来，转入水解液中(液面应没过凝胶)，待指示剂(溴酚蓝或二甲苯青)颜色改变后再过 10 min [b, c]。

↓

ⓑ 用双蒸水漂洗凝胶后转至变性液中，室温下振荡 30 min 以变性 DNA [d]。

↓

ⓒ 用双蒸水漂洗凝胶后转至中和液中，室温下振荡 30 min。

↓

ⓓ 弃去中和液，用双蒸水漂洗凝胶。

↓

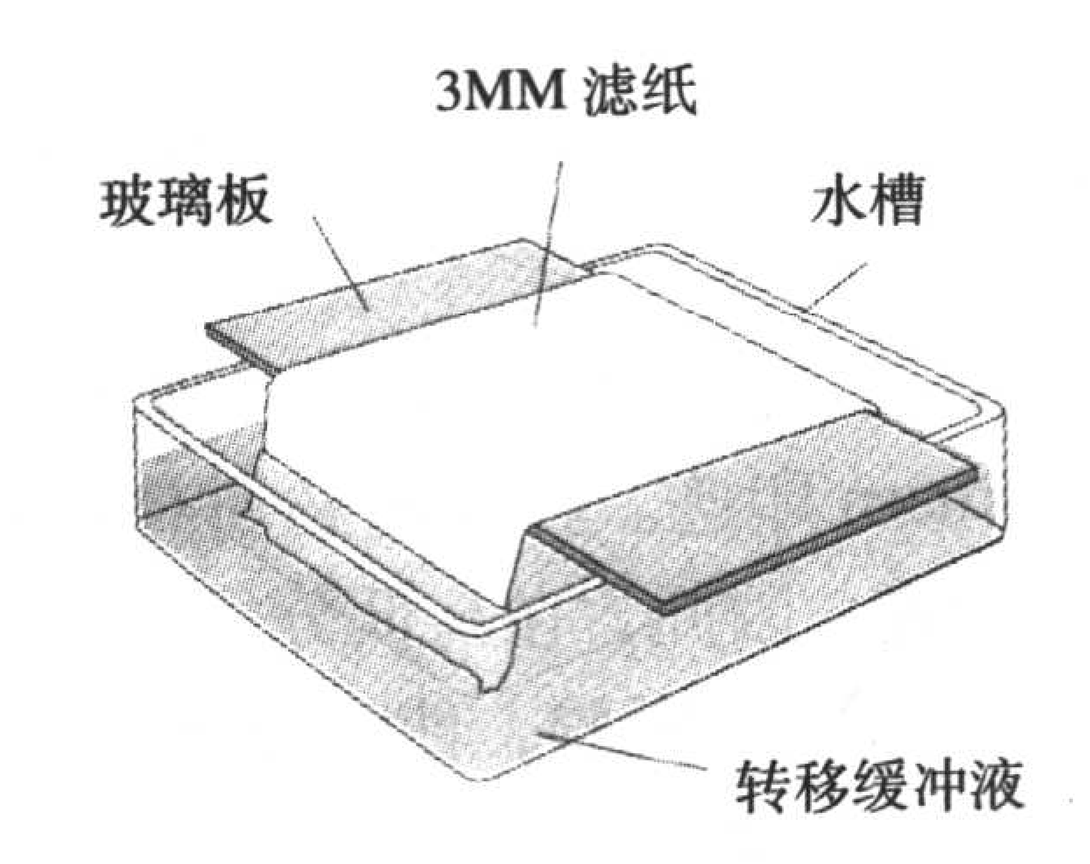
ⓔ 按下图所示安装转膜装置，槽中加转移缓冲液，架设玻璃板作为胶台，用转移缓冲液浸湿的 3 MM 滤纸跨过玻璃板，伸入至缓冲液中 [e]。

b. 10 kb 以上的大片段用酸将其降解成小片段，10 kb 以下的片段可以不经酸处理。

c. 酸处理后，溴酚蓝变黄，二甲苯青变为黄绿色。

d. 凝胶重新恢复到原来颜色后，再等 15 min。

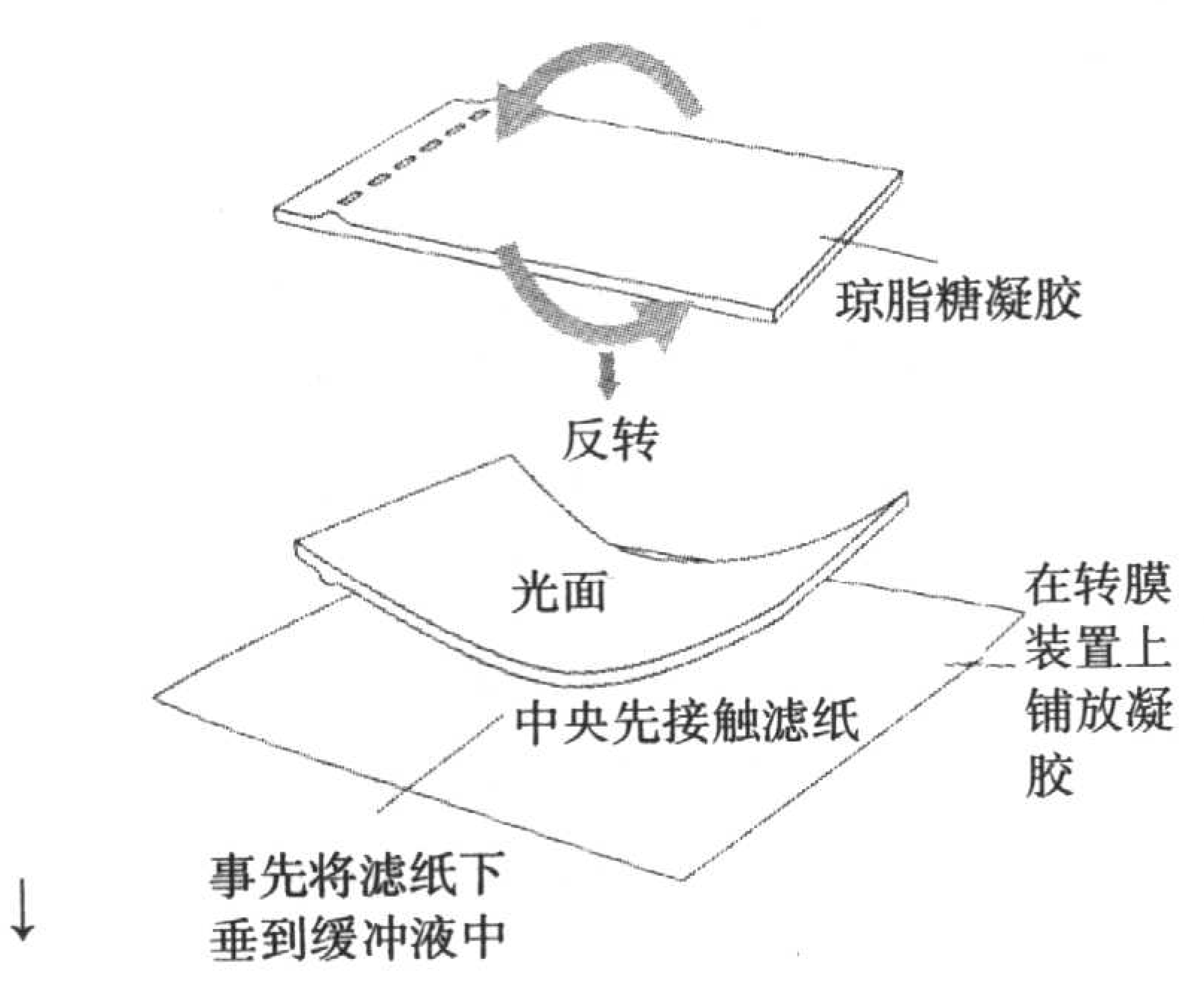
e. 缓冲液将沿滤纸上移，因此水槽内应加足量缓冲液。



↓

ⓕ 将凝胶反转，正面朝下置于 3 MM 滤纸上。注意不要产生气泡，因气泡会中断转移[f~h]。

f. 从这步以后的所有操作均应戴手套，不要用手直接接触。
g. 一定要让膜与凝胶紧密接触。
h. 铺放凝胶时，应事先将滤纸下垂到缓冲液中，并浸湿，这样不易形成气泡。



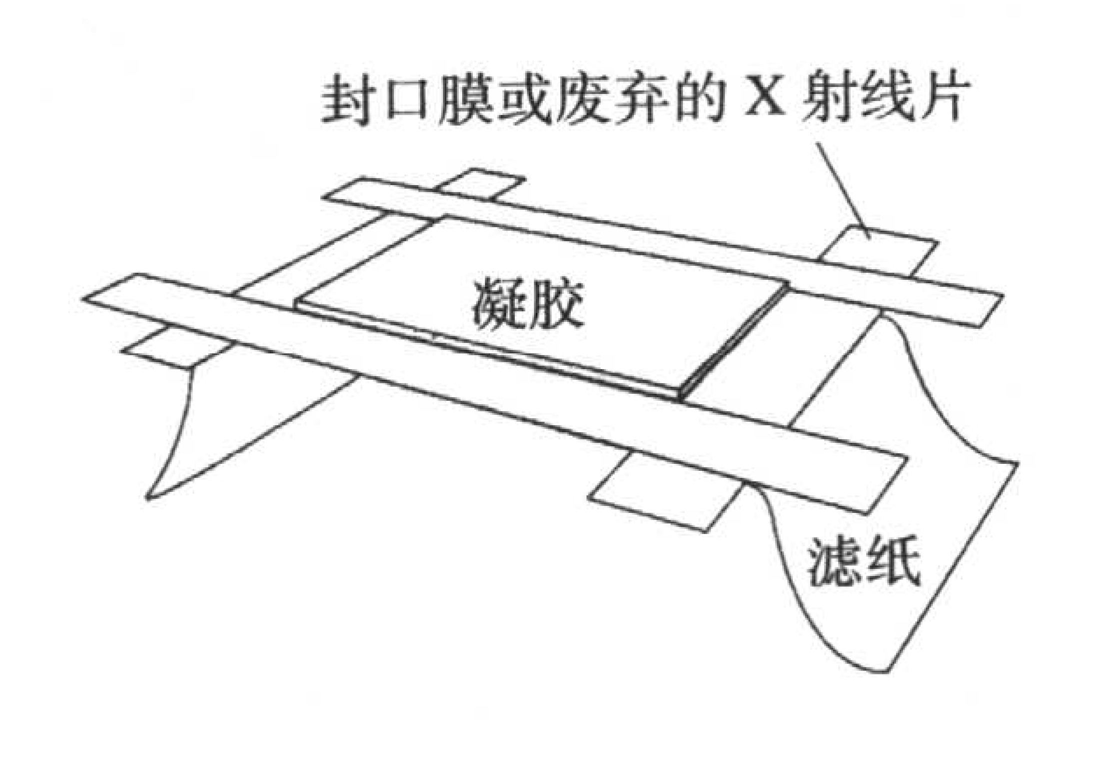
↓

ⓖ 为防止缓冲液从凝胶旁边渗入到放置在凝胶上的吸水纸上，应在凝胶四周铺一层封口膜或废弃的 X 射线片等。

↓

ⓗ 将与凝胶大小相同的杂交膜铺在凝胶上。注意避免气泡产生[i~k]。

i. 杂交膜上务必不要留下手痕，因此操作时一定要戴手套。为了不划伤凝胶，最好戴上医用指甲套。
j. 用戴指甲套的手指小心地拿住膜两侧，先让膜中间接触凝胶，然后逐渐放下，这样不易产生气泡。
k. 有些杂交膜不需事先用缓冲液浸湿，使用时参阅产品说明书。
l. 干滤纸因吸水而易与杂交膜形成气泡，因此宜使用浸湿的滤纸。



↓

ⓘ 准备 3 张与凝胶大小相同、用缓冲液事先浸泡的滤纸铺在凝胶上[l]。

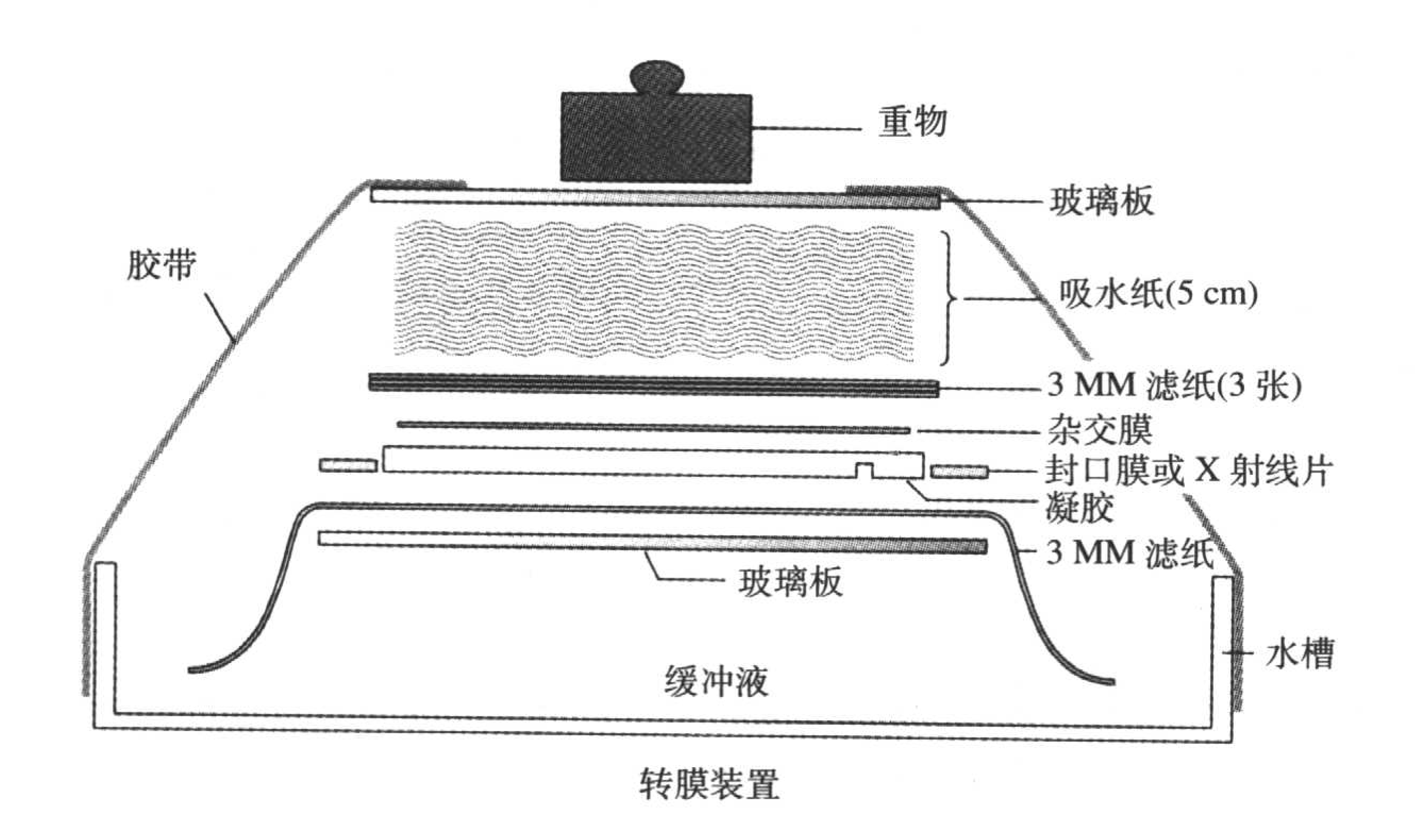
↓

ⓙ 剪一些大小合适的吸水纸巾，置于其上，厚度约 5 cm。

↓

ⓚ 纸巾上放一玻璃板，中间再放一重物(约 1 kg)，静置 4~16 h [m]。

m. 转膜装置在静置过程中可能会倒塌，因此最好用胶带固定住。



转膜装置

↓ O/N

ⓛ 小心取下重物、玻璃板、纸巾和滤纸，膜与凝胶一起反转过来。注意不要使它们分离。

↓

ⓜ 在凝胶点样孔位置用圆珠笔做一标记 [n, o]。

↓

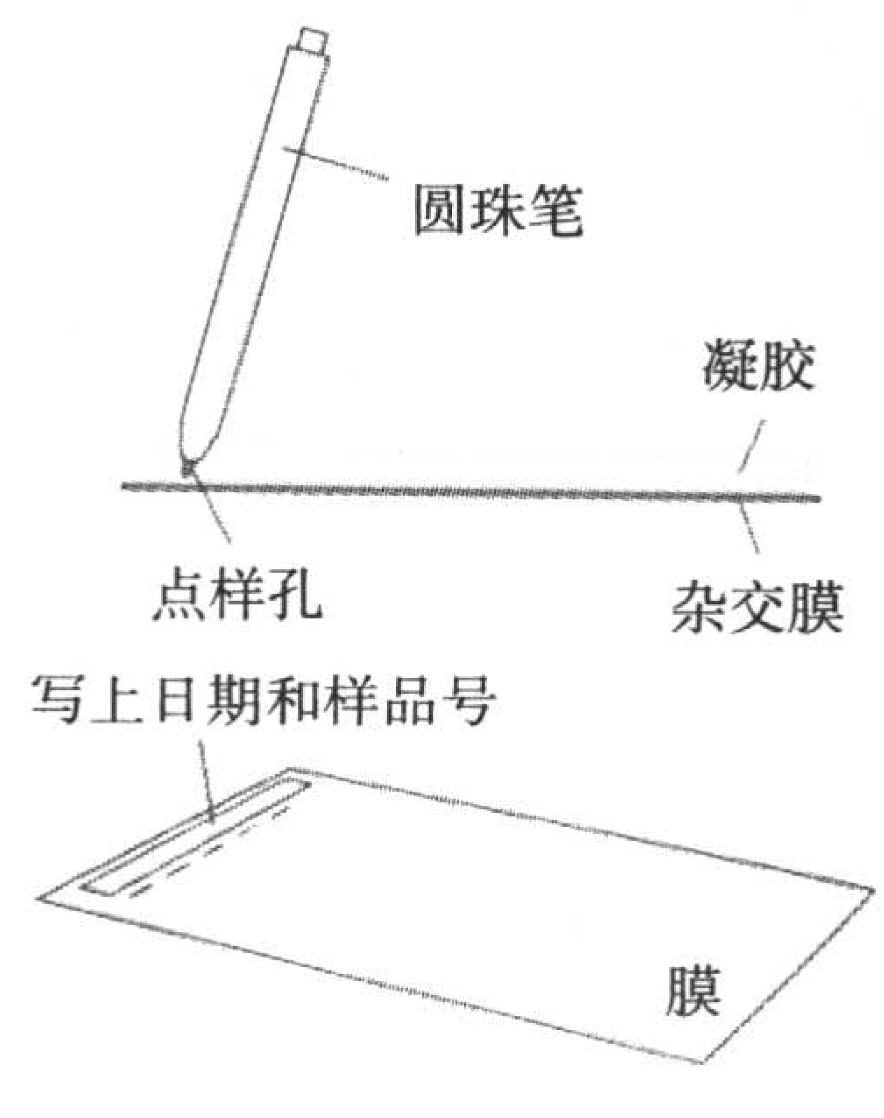
ⓝ 杂交膜的转移面朝上，铺于用 0.4 mol/L NaOH 溶液浸湿的滤纸上，使转移的 DNA 固定到杂交膜上，然后用 5×SSC 溶液漂洗，并烘干 [p, q]。

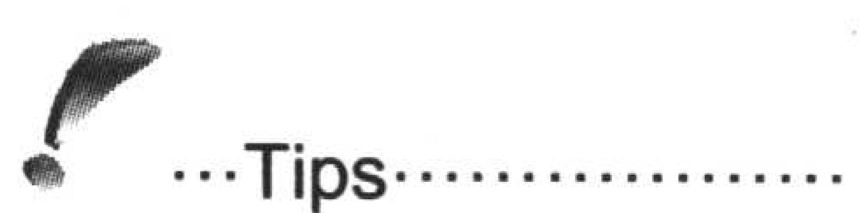
n. 该操作使杂交膜内外变得容易区分。膜上写上样品号和日期。

o. 凝胶转膜后再用 EB 染色，检测转膜是否完全。

p. 固定方法因膜而异。除 NaOH 法外，也可用紫外交联或 DNA 杂交炉等方法。

q. 膜在−20℃下可保存数月。





以上流程对所有膜均适用。对于 Hybond-N$^+$可用 0.4 mol/L NaOH 取代 20×SSC，因此转膜前的变性及转膜后的固定步骤可以省略。但下述步骤绝对不能省略：第ⓐ步到第ⓓ步的双蒸水漂洗。转移的膜用圆珠笔标记后可用 20×SSC 漂洗，风干。

2. 电转移

Materials

(1) 电转移装置

(2) 带正电荷的尼龙杂交膜[a]

(3) 紫外交联仪

(4) 一次性手套

(5) 转移缓冲液

200×储液(0.1 mol/L Tris·Ac pH8.0，0.05 mol/L EDTA)

(6) 变性液

1.5 mol/L NaCl、0.5 mol/L NaOH

(7) 中和液

1.5 mol/L NaCl、0.5 mol/L Tris·HCl pH7.2、10 mmol/L EDTA

(8) 2×SSC(附录一)

a. Hybond-N^+虽带正电荷，但不适合某些电转移装置。

Protocols　　Time：2 h

ⓐ 凝胶照相后，剥离下来，移入到装有双蒸水的水槽中，振荡 30 min(脱盐)，换水后再脱盐一次[b]。

b. 脱盐不彻底，电转移效率低。

↓

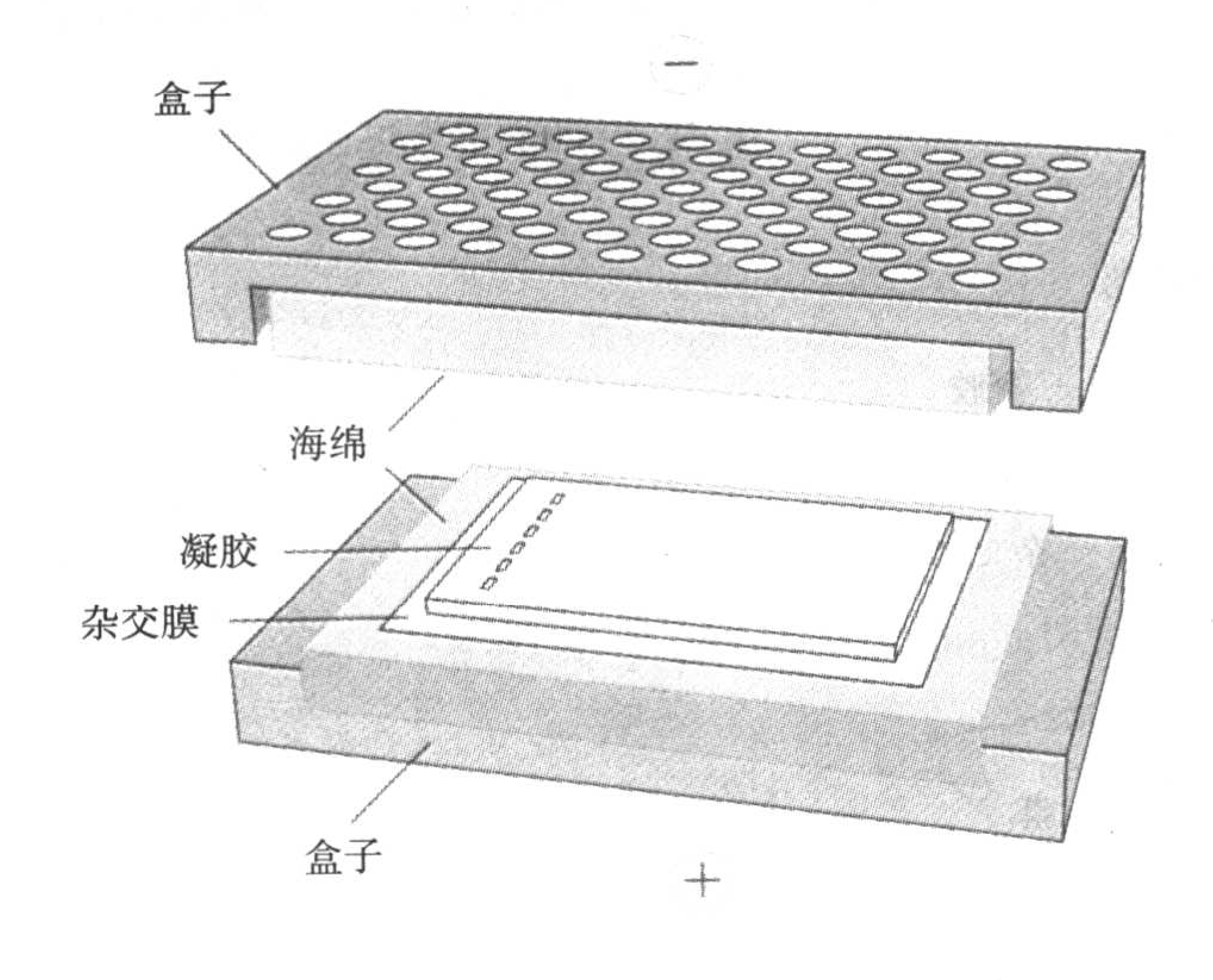
ⓑ 将带正电荷的尼龙杂交膜浸于乙醇中数十秒，再浸于双蒸水中 15 min，然后再浸于转移缓冲液中 15 min。

↓

ⓒ 用1×转移缓冲液浸泡海绵，凝胶与膜按下图放置[c,d]。

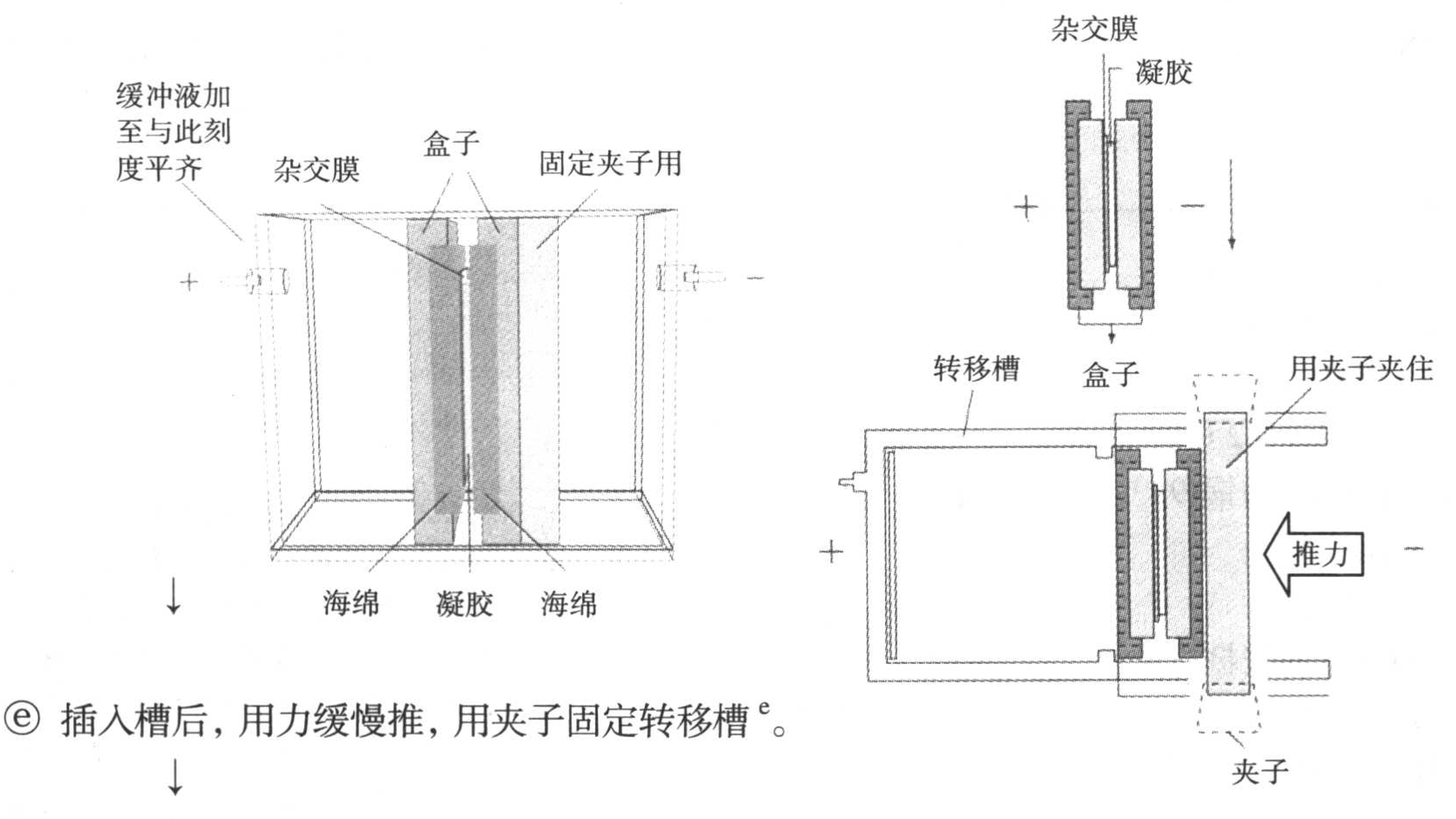
c. 海绵应稍大些，膜应比凝胶大 5 mm 左右。

d. 杂交膜放正极，无点样孔凝胶面朝下，注意避免产生气泡。



↓

ⓓ 按下图所示安装转移槽。膜朝正极。



↓

ⓔ 插入槽后，用力缓慢推，用夹子固定转移槽[e]。

↓

ⓕ 1×转移缓冲液加至指定刻度[f]。

↓

ⓖ 200 mA 恒流转移 11~15 min。检查电压是否为 500 V[g, h]。

↓

ⓗ 转膜完毕，凝胶与膜一起取下，用圆珠笔在杂交膜上标记点样孔位置。

e. 用力过猛，带型不明显。
f. 转移缓冲液预先加入转移槽中。
g. 有些装置在 200 mA 时不是 500 V。若不是，则改变缓冲液稀释倍数，使之接近 500 V。适当改变稀释倍数不影响转膜效果，但 500 V 以下的低电压不利于转膜。
h. 转多张膜时，应更换缓冲液。

↓

ⓘ 在干净薄膜上铺一层变性液浸泡的滤纸，转移面朝上，铺于滤纸上，静置约 1 min 至指示剂变色，以使膜上的 DNA 变性。

↓

ⓙ 与ⓘ步操作相同，换成中和液，指示剂又恢复为原来颜色。

↓

ⓚ 与ⓘ、ⓙ相同，用 2×SSC 湿润滤纸铺于杂交膜上。

↓

ⓛ 将吸水纸巾铺于其上，使膜干燥。

↓

ⓜ 紫外照射 2~5 min，固定 DNA 于杂交膜上[i]。

i. 膜于−20℃下可保存数月。紫外线的波长与强度的设置应参考杂交膜产品说明书。

第四节　杂　　交

所谓杂交是指具有一定同源性的两条核酸单链，在适当温度和离子强度下，按碱基互补方式形成杂交双链的过程。用于杂交的双方一般是待测核酸分子和标记核

酸探针。操作上主要是提高探针与特异 DNA 结合能力的同时，减少探针与非特异 DNA 的结合能力。为此，需选择合适缓冲液以提高特异带的杂交信号，同时减少背景亮度。

Materials

(1) 盖革计数器

(2) X 射线片

(3) 增感屏

(4) 恒温箱(42℃)

(5) 恒温水浴锅(95℃)

(6) 杂交袋

(7) 封塑机

(8) 硫酸葡聚糖[a]

(9) 2×SSC(附录一)/0.1% SDS(附录一)

(10) 0.2×SSC(附录一)/0.1% SDS(附录一)

(11) 预杂交/杂交缓冲液

100%甲酰胺	5 mL
20×SSC(附录一)	2.5 mL
100×Denhardt 溶液[b](附录一)	0.56 mL
1 mol/L 磷酸钠盐[c]	1 mL
10%SDS(附录一)	0.5 mL
10 mg/mL 鲑鱼精 DNA[d]	100 μL

用双蒸水定容至 10 mL

(12) 探针(随机法标记探针，$1×10^8$ cpm/μg DNA 以上)

a. 50%硫酸葡聚糖溶液的配制方法：先加 100 mL 双蒸水到耐热试剂瓶中，用记号笔标记其高度，然后倒掉双蒸水，再加入 50 g 硫酸葡聚糖粉末，再加双蒸水至刻度，搅拌片刻，液面将下降，再补加双蒸水至刻度，液面将再下降，如此反复直至硫酸葡聚糖溶解为止，然后高温高压灭菌。

b. 100× Denhardt 溶液：

2% BSA(牛血清白蛋白)；

2% Ficoll 400；

2% PVP(聚乙烯吡咯烷酮)。

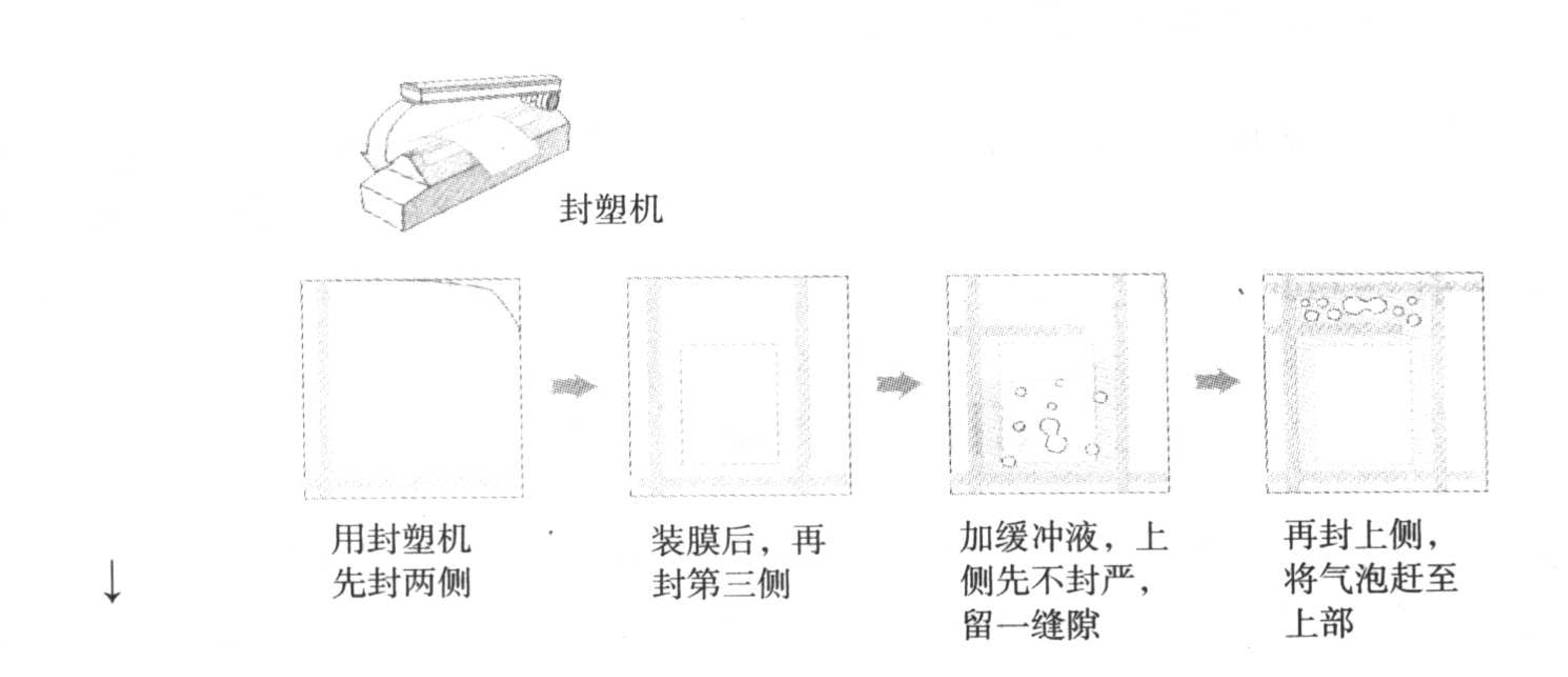
c. 在 1 mol/L NaH_2PO_4 中加少量 1 mol/L Na_2HPO_4，至 pH6.5。

d. 在沸水中煮 5 min，使之变性。

Protocols　　Time：15~20 h

ⓐ 将杂交膜装入杂交袋中，杂交袋的三边用封塑机封边。加入杂交缓冲液[e]，并将气泡赶往一侧(如下图)。

e. 100 cm^2 杂交膜加 5 mL 缓冲液。



↓

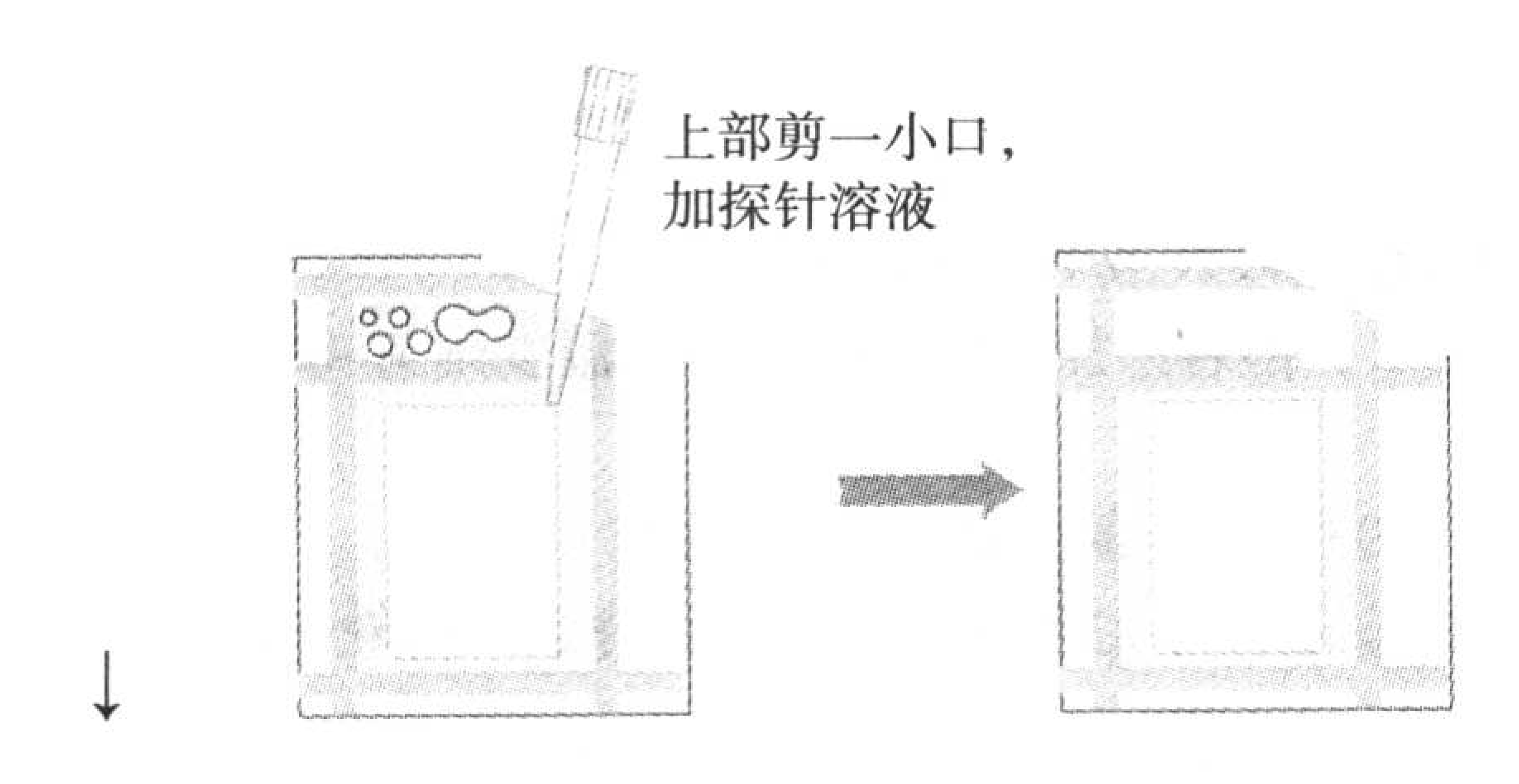
ⓑ 42℃恒温箱中，边振荡边预杂交 30 min [f]。

↓

ⓒ 探针在 95℃下煮 5~10 min，骤冷，使其变性。并在缓冲液中补加 1/4 体积的硫酸葡聚糖溶液 [g]。从这一步开始，应在同位素实验室进行操作。

↓

ⓓ 剪掉杂交袋一角，每毫升缓冲液加 0.5×10^6~1×10^6 cpm 探针。为了使探针均匀分布在杂交液中，可用移液器吸打缓冲液。混匀后，将气泡集中一角 [h]。



↓

ⓔ 42℃恒温箱中振荡 12~18 h，使之杂交 [i]。

↓ O/N

ⓕ 从袋中取出杂交膜，转入装有 2×SSC/0.1% SDS 的溶液中，室温下振荡 5 min [j, k]。

↓

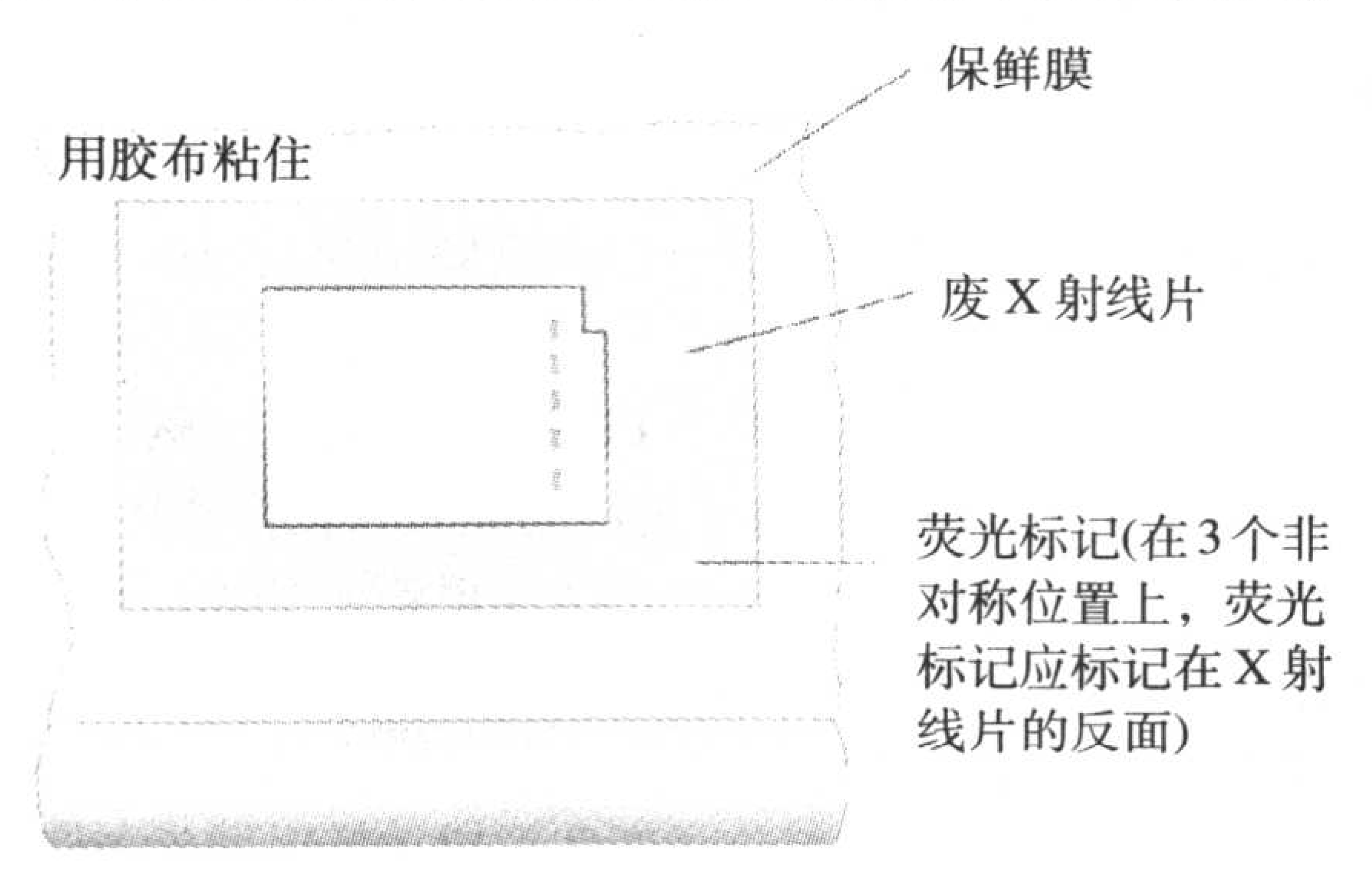
ⓖ 杂交膜转至新的 2×SSC/0.1% SDS 溶液中，42℃振荡 15 min [l, m]。

↓

ⓗ 杂交膜转至 0.2×SSC/0.1% SDS 溶液中，42℃振荡 15 min [n~p]。

↓

ⓘ 用保鲜膜包裹住杂交膜，放在 X 射线片合适位置。



↓

f. 预杂交/杂交温度取决于探针与目的 DNA 的配对情况。100%配对时用 42℃，比例越低，杂交温度越低。由于低于 37℃时背景很高，因此应选择 37℃以上温度。

g. 硫酸葡聚糖能促进杂交，但也增强了背景。为了获得强的特异信号，可加 1/8 或更少量的硫酸葡聚糖。

h. 不可将探针直接加到膜上，应从侧面加入。

i. 注意防止污染，杂交袋下应先铺一层铝箔纸或吸水纸巾。

j. 注意防止污染，杯子下应先铺一层铝箔纸或吸水纸巾。最初的洗液中带有非常强的放射性物质。

k. 冬天 SDS 易析出，应稍微保温。

l. 洗液应预热。

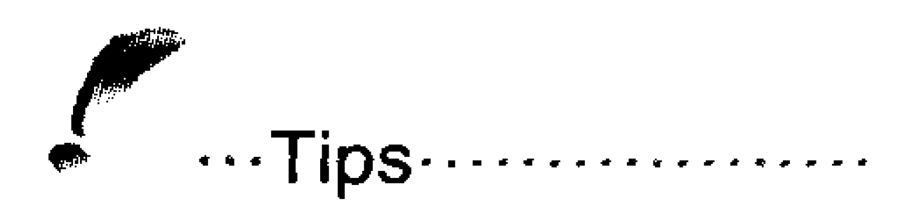
m. 用盖革计数器检测杂交膜的背景信号，应该很低。若背景仍高，有可能实验失败了，可尝试反复冲洗非特异性信号。

n. 用盖革计数器检测杂交膜的背景信号，直至计数在 300 cpm 以下为止。

o. 可能比ⓖ步计数还低，但没有关系。室温下用 0.2×SSC/ 0.1% SDS 冲洗几分钟，会突然出现背景信号降低、目标带信号增强的现象。

p. 洗液的盐离子浓度越低，SDS 越浓，探针越易掉落。若这一步的计数仍较高的话，可用 0.1×SSC/0.1% SDS 冲洗。

ⓙ 将杂交膜转移至夹有增感屏和 X 射线片的暗盒中，−70℃曝光。



1. 杂交缓冲液

除了前面介绍的杂交缓冲液外，还有以下几种，有些添加甲酰胺，有些则不添加。甲酰胺对 DNA 变性有利，但对探针结合不利。因此，添加了甲酰胺的缓冲液比不添加的杂交条件要温和些，背景弱一些，特异带清晰一些。

(1) 非变性 Denhardt 缓冲液(杂交温度为 68℃)：

5×SSC

5×Denhardt 试剂

0.5% SDS

100 μg/mL 鲑精 DNA

该缓冲液常用于尼龙膜的杂交，如 Hybond-N 或 N^+、Immobilone 等。

(2) BLOTTO 缓冲液(杂交温度为 68℃，但若添加了甲酰胺，杂交温度则为 42℃)：

6×SSC

0.05×BLOTTO(5% 脱脂奶粉 + 0.02% 叠氮化钠)/50%甲酰胺

该缓冲液常用于硝酸纤维素膜的杂交。若用于尼龙膜，易产生高背景。此外，该缓冲液不适用于 Northern 印迹。

(3) BSA 缓冲液(杂交温度为 68℃)：

参考第二十四章第一节 Northern 印迹。该缓冲液可用于任何膜的杂交，但因为 SDS 浓度较高，容易产生盐析现象，因此应使用保温装置。

(4) QuickHyb(杂交温度为 42℃)：

该缓冲液杂交只需 1 h，可用于尼龙膜的杂交。

2. 杂交反应的条件及参数的优化

(1) 根据杂交液体积确定杂交时间：一般来说使用较小体积的杂交液比较好，因为在小体积溶液中，核酸重新配对的速度快、探针用量少，从而使滤膜上的 DNA 在反应中起主要作用。但杂交时必须有足够的杂交液覆盖杂交膜。

(2) 根据所用杂交液确定杂交的温度：一般来说，杂交液为水溶液时，则在 68℃杂交，而在 50% 甲酰胺溶液中时，则在 42℃下杂交。

(3) 选用不同的封闭试剂：如 Denhardt 试剂、肝素或一种由 5%脱脂奶粉组成的 BLOTTO，这些试剂中需加入断裂的鲑鱼精 DNA 或酵母 DNA，并和 SDS 一起使用。与 Denhardt 试剂相比，BLOTTO 价格便宜，使用方便，同样可获得满意的结果，但它不能用于 RNA 杂交。一般而言，尼龙膜用 Denhardt 试剂比用 BLOTTO 能得到更高的信噪比。对硝酸纤维素膜而言，通常在预杂交溶液和杂交溶液中都含有封闭剂。但对于尼龙膜，经常从杂交溶液中省去封闭剂，因为高浓度的蛋白质会干扰探针和目的基因的退火。

(4) 根据需要在杂交过程中选用不同的振荡方法和振荡速率，许多杂交膜一起反应时，连续的轻微振荡可获得较好的杂交结果。

(5) 在杂交体系中加入其他化合物，如 10% 硫酸葡聚糖或 10% PEG，杂交速度可提高约 10 倍，检测稀有序列时常用该方法。但它们有时会导致本底较高，并由于溶液的黏稠而使操作困难。因此，除非滤膜上含目的 DNA 量很少，或放射性探针的量有限，一般不用硫酸葡聚糖或 PEG。

(6) 根据探针与被检测目标之间的同源程度来选择清洗的方式，如具有很高的同源性可选用严紧型洗脱方式(高浓度 SSC)，反之则选用非严紧型洗脱方式(低浓度 SSC)。洗脱通常在低于杂交体解链温度 12~20℃的条件下进行。解链温度(T_m)是指在双链 DNA 或 RNA 分子变性形成单链时紫外吸收增加值中点处的温度。通常富含 G · C 碱基对的序列比富含 A · T 碱基对的序列 T_m 高。

(7) 根据标记探针的浓度及其比活性，选择不同的杂交条件及检测方法。一般使用新的同位素可获得较强的信号。

(8) 在水溶液中杂交时，用 6×SSC 溶液与 6×SSPE 溶液的效果一样。但在甲酰胺溶液中杂交时，应该用具有更强缓冲能力的 6×SSPE。

上述条件的改变对杂交的结果有不同的影响，应根据研究的具体情况，选用适当的方法。

3. 杂交中存在的问题及解决方法

问题	原因	解决办法
斑点	1) 存在不溶颗粒	1) 加热至合适的温度；离心或过滤除去颗粒
	2) 膜上存有未稀释的探针	2) 不要把探针直接加到膜上
	3) 手套上的粉末	3) 戴无粉末的手套
	4) 气泡	4) 一直用均匀的溶液和底物覆盖膜
高背景	1) 探针浓度过高	1) 降低探针浓度
	2) 封闭不充分	2) 延长封闭时间
	3) 严紧度洗脱无效	3) 提高洗膜温度，增加表面活性剂，降低盐浓度
	4) 滤纸被污染	4) 用高质量的滤纸接触膜
无信号	1) 曝光时间太短	1) 曝光时间延长
	2) 转膜不完全	2) 通过 EB 染色确定转膜效果
	3) HRP 失活	3) 点试验检测探针活性
	4) 探针浓度太低	4) 增加探针浓度
	5) 目标基因浓度太低	5) 增加目标基因浓度，或延长曝光时间
	6) 目标基因变性不完全	6) 转膜前充分变性
	7) 目标基因没有恰当固定	7) 固定之前，将膜浸入 1×TE 或水中
	8) 探针损失于塑料袋中	8) 用低吸收度塑料袋
	9) 洗膜条件严紧度太高	9) 洗膜时，增加盐浓度，降低表面活性剂浓度或温度
	10) 寡聚核苷酸太短，且膜标记过	10) 寡聚核苷酸必须大于 50 bp
非特异带	1) 探针太多	1) 降低探针浓度
	2) 洗膜不充分	2) 降低 SSC 浓度
	3) 温度不正确	3) 检查温度
	4) 目标基因太多	4) 减少目标基因浓度
	5) EB 或胶中污染物阻碍杂交	5) 用 1×TE 或 0.1% SDS 充分洗膜

…Questions………………

1. 简述 Southern 印迹的主要原理和所包括的实验步骤。
2. 要获得好的 Southern 印迹结果，需注意哪些事项？
3. 放射自显影后，如 X 射线片背景很黑，分析其原因并写出预防措施。
4. Southern 转移中脱嘌呤的时间为何不能太长？
5. 如何增强特异杂交带信号，减少非特异杂交带信号？如果杂交后出现 Southern 非特异性带，分析其可能的原因和相应的对策。
6. Southern 印迹流程是否可应用于 Northern 印迹？如果不可以，需做哪些修改才可应用于 Northern 印迹？

第十七章　分 子 标 记

许多生物已完成了基因组或 cDNA 序列测定工作，这些序列信息都储存在 GenBank 数据库中，如何利用这些信息来加速研究是许多人在思考的问题。基因作图、突变株的分子标记、标记信息的利用等是目前最常用的手段之一。

第一节　微卫星标记

1. 原理

由 1~7 个核苷酸串联重复而成的微卫星 DNA 广泛分布于基因组中，其串联重复程度在不同材料间存在多态性，因此可作为分子标记。由于微卫星两侧序列是单拷贝序列，因此可根据两侧序列设计一对特异引物，通过 PCR 和电泳可检测串联重复的长度多态性(图 17-1)。微卫星标记方法所用基因组 DNA 量少，所完成的遗传图与基因图或物理图的对应关系明确，因此被广泛应用于标记研究。

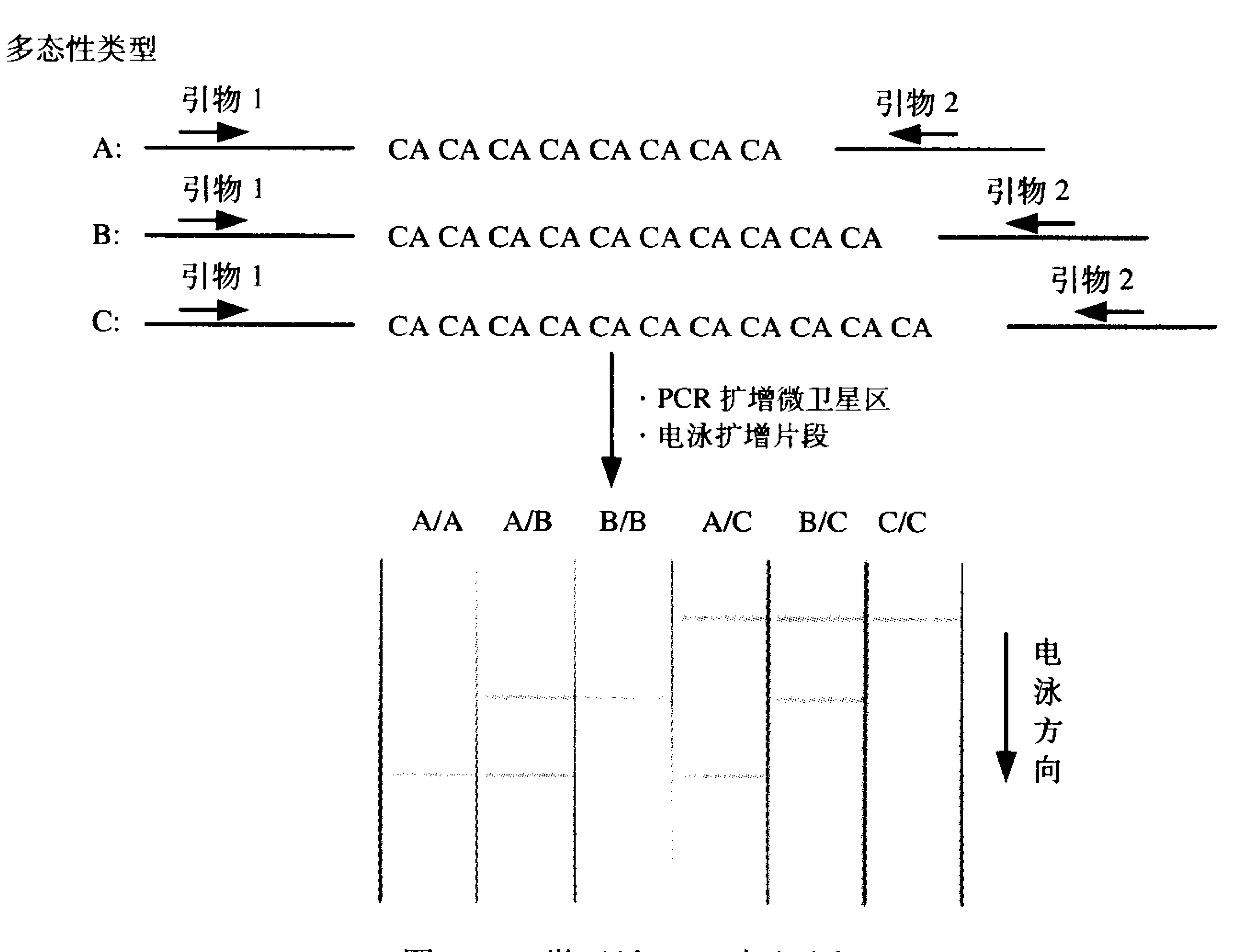


图 17-1　微卫星 DNA 标记原理

2. 实际应用

Materials

(1) PCR 仪(MJ Research PTC-200)　　(2) PCR 管

(3) 电泳槽
(4) 制胶器[a]
(5) *Taq* DNA 聚合酶
(6) 10×PCR 添加缓冲液
(7) 2.5 mmol/L dNTP
(8) 样品 DNA
(9) 引物
(10) 10×DNA 点样缓冲液
(11) 琼脂糖[b]

a. 面积最好大一些，如 13cm×14cm。
b. BMA 公司的琼脂糖的分辨力与聚丙烯酰胺凝胶差不多。

Protocols　　Time：8 h

ⓐ 设计 PCR 引物。引物长度以 20 mer、扩增片段长度以 100~200 mer 为宜。

↓

ⓑ PCR 反应体系：

DNA 溶液[c]	1 μL
10×PCR 缓冲液	2 μL
2.5 mmol/L dNTP	1.6 μL
引物 1(10 pmol/μL)	0.5 μL
引物 2(10 pmol/μL)	0.5 μL
Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)	0.2 μL
无菌水	14.2 μL
总体积	20 μL

c. 使用的基因组 DNA 量因材料而异，若是人基因组 DNA，则 100 ng 较合适。

↓

ⓒ 混匀，并甩至管底。

↓

ⓓ PCR 反应，标准的循环条件为：

94℃	5 min	
94℃	45 s	30 循环[d]
55℃[d]	45 s	
72℃	2 min	
72℃	7 min	
4℃	∞	

d. 退火温度因引物 T_m 值而异。循环数应通过预实验进行优化。

↓

ⓔ 用 TBE 缓冲液制作 3% MetaPhore 琼脂糖凝胶，胶厚 6 mm。尽可能选择在平整的地方制胶，室温凝固后再在 4℃冷却 20 min。

↓

ⓕ 10 μL PCR 产物中加 1 μL 10×点样缓冲液，混匀后点样。选用低相对分子质量标准物来标定[e]。

↓

ⓖ 4.5 V/cm 强度下电泳 3~6 h[f]。

↓

e. 如 20 bp DNA Ladder。
f. 该条件下，溴酚蓝迁移与长度为 35 bp DNA 片段大致相等，据此来确定电泳时间。

ⓗ EB 染色 30 min，分析电泳图谱(图 17-2)。

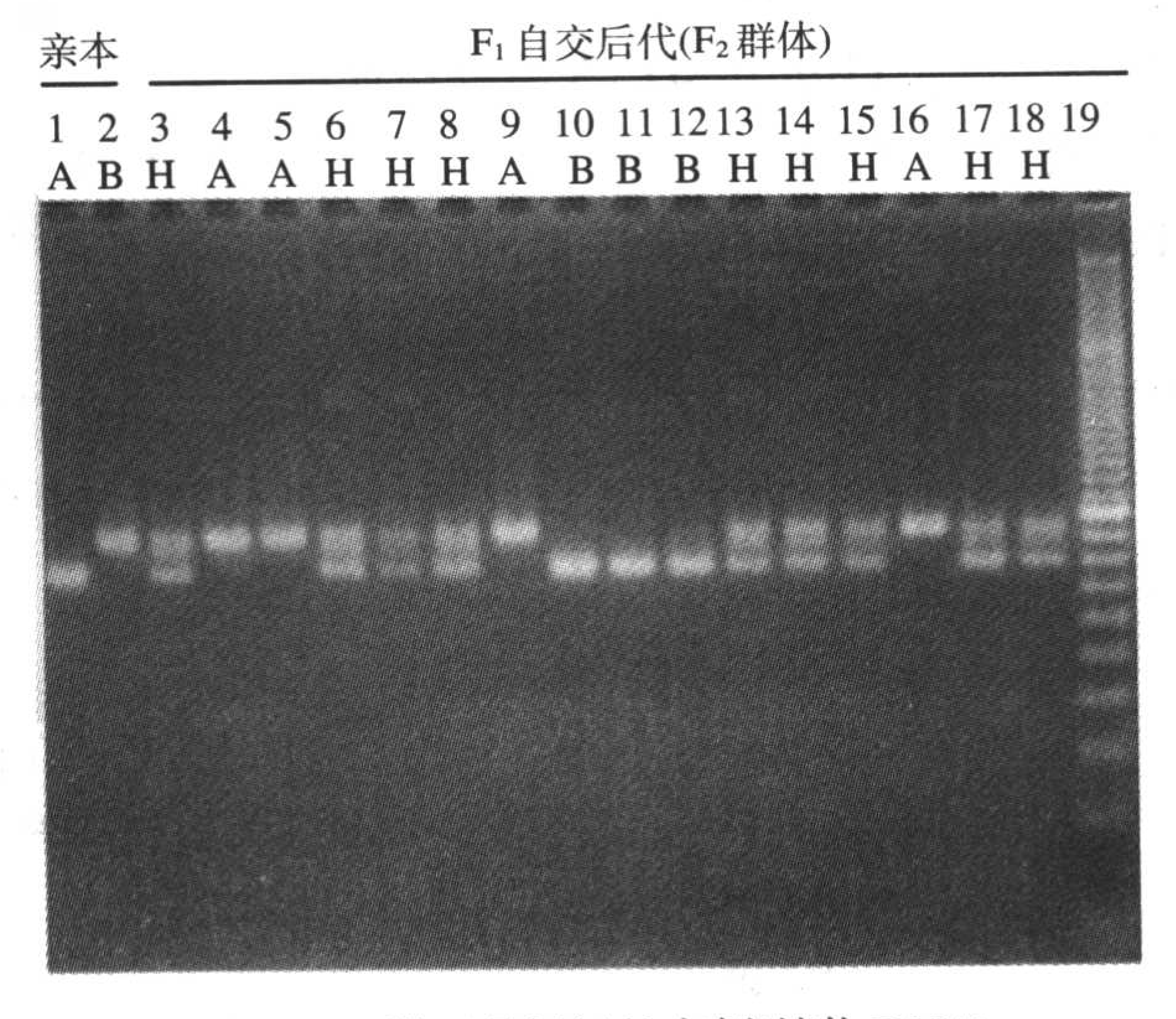
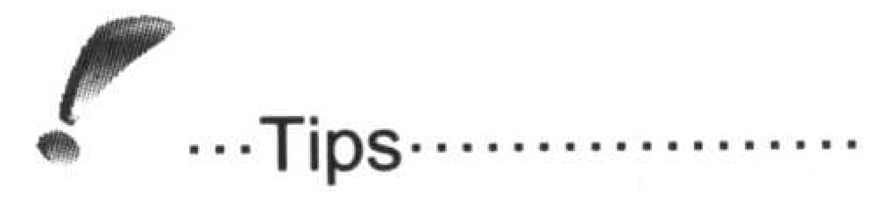


图 17-2　微卫星标记的实例(植物 DNA)

泳道 1：亲本 1，多态性类型为 A(A/A)；泳道 2：亲本 2，多态性类型为 B(B/B)；
泳道 3：亲本 1 与 2 杂交 F_1 代，多态性类型为 H(A/B)；泳道 4~18：F_1 自交后代(F_2 群体)，
多态性类型为 A、B 或 H；泳道 19：20 bp Ladder 标准物



可在室温下电泳。若条件允许，在低温下电泳可提高分辨力。可用 8%聚丙烯酰胺凝胶代替 3% MetaPhore 琼脂糖。

第二节　RFLP 与 RAPD

1. 概述

RFLP(restriction fragment length polymorphism，限制性片段长度多态性)是根据不同品种(个体)基因组 DNA 的限制性内切核酸酶酶切位点的碱基发生突变，或插入或缺失或置换，从而导致酶切片段大小发生改变，再通过与特定探针杂交检测出这种改变，从而可比较不同品种(个体)间 DNA 水平差异(即多态性)。所用探针多为来源于同种或不同种基因组 DNA 的克隆，分布于染色体不同位点，从而可作为一种分子标记方法，通过多个探针结果的综合比较而构建出其遗传图谱，确立其生物进化关系和分类学地位。

当某个性状(基因)与某个(些)分子标记协同分离时，表明这个性状(基因)与分子标记连锁。分子标记与性状之间交换值的大小，表示目标基因与分子标记之间的距离，从而可将基因定位于遗传图谱上。分子标记克隆在质粒上，可以繁殖及保存。不同限制性内切核酸酶切割基因组 DNA 后，所切片段类型不一样，因此限制性内切核酸酶与分子标记组成不同组合进行研究。常用的限制性内切核酸酶一般是 *Hin*d III、*Bam*H I、*Eco*R I、

*Eco*R V 及 *Xba* I，而分子标记则有几个甚至上千个。分子标记越多，所构建的图谱就越饱和，构建饱和图谱是 RFLP 研究的主要目标之一。

运用随机引物扩增多态性 DNA 片段作为分子标记的方法即为 RAPD(random amplified polymorphic DNA，随机扩增的多态性 DNA)。尽管 RAPD 技术诞生时间很短，但由于其独特的检测 DNA 多态性方式及快速、简便的特点，使该技术渗透于基因组研究的各个领域。RAPD 技术建立于 PCR 技术基础上，它利用一系列(通常数百个)不同的随机排列碱基顺序的寡聚核苷酸单链(通常为 10 聚体)为引物，对所研究基因组 DNA 进行 PCR 扩增，琼脂糖电泳分离，EB 染色，来检测扩增产物 DNA 片段多态性，这些扩增产物 DNA 片段多态性反映了基因组相应区域的 DNA 多态性。RAPD 所用一系列引物 DNA 序列各不相同，但对于任一引物，同基因组 DNA 序列有其特异结合位点，这些特异结合位点在基因组某些区域内的分布若符合 PCR 扩增反应条件，即引物在模板两条链上有互补位置，且引物 3'端相距在一定长度范围内就可扩增出 DNA 片段。因此如果基因组在这些区域发生 DNA 片段插入、缺失或碱基突变就可导致这些特定结合位点分布发生相应的变化，而使 PCR 产物增加、缺少或发生分子质量的改变。通过对 PCR 产物电泳检测即可检测其基因组 DNA 多态性。分析时可用的引物数量很大，虽然对每一个引物而言其检测基因组 DNA 多态性区域有限，但利用一系列引物则可使检测区域几乎覆盖整个基因组，因此 RAPD 可对整个基因组 DNA 进行多态性检测。另外，RAPD 片段克隆后可转化为 RFLP 标记进行作图分析。

2. RFLP 实例

Materials

(1) 0.5mL Eppendorf 管

(2) 电泳仪及电泳槽

(3) 照相用的塑料盆

(4) 玻璃或塑料板(比胶块略大)

(5) 吸水纸若干

(6) 尼龙膜(依胶大小而定)

(7) 滤纸

(8) 基因组 DNA(大于 50 kb，分别来自不同材料)

(9) 限制性内切核酸酶(*Bam*H I、*Eco*R I、*Hind* III、*Xba* I)及相应 10×酶切缓冲液

(10) 5×TBE 电泳缓冲液(附录一)

(11) 变性液

0.5 mol/L NaOH/1.5 mol/L NaCl

(12) 中和液

1 mol/L Tris · HCl(pH7.5)(附录一)/1.5mol/L NaCl

(13) 20×SSC(附录一)

(14) 0.4 mol/L NaOH

(15) 0.2 mol/L Tris · HCl(pH7.5)/2×SSC(附录一)

(16) 0.8% 琼脂糖凝胶

(17) 0.25 mol/L HCl

Protocols　　Time：3~4 d

(1) 酶切基因组 DNA

ⓐ 大片段 DNA 的提取详见基因组 DNA 提取实验，要求提取的 DNA 相对分子质量大于 50 kb，没有降解。

↓

ⓑ 在 50 μL 反应体系中进行酶切反应：

5 μg 基因组 DNA

5 μL 10×酶切缓冲液

20 U 限制性内切核酸酶(任选一种)

加双蒸水至 50 μL

↓

ⓒ 轻微振荡，离心，37℃酶切过夜。

↓ O/N

ⓓ 取 5 μL 酶切液，0.8%琼脂糖电泳观察酶切是否彻底，这时不应有大于 30 kb 明显亮带出现。

(2) Southern 印迹[a, b]

ⓐ 酶切 DNA 经 0.8%琼脂糖凝胶电泳(可用 18 V 过夜)后 EB 染色观察。

↓ O/N

ⓑ 将凝胶浸没于 0.25 mol/L HCl 中 10 min(脱嘌呤)[c]。

↓

ⓒ 取出胶块，蒸馏水漂洗，转至变性液变性 45 min。经蒸馏水漂洗后转至中和液中，中和 30 min。

↓

ⓓ 预先将尼龙膜、滤纸浸入水中，再浸入 10× SSC 中，将一玻璃板架于盆中，上铺一层滤纸(桥)。然后将胶块反转放置，盖上尼龙膜，上覆 2 层滤纸，再加盖吸水纸，压上 0.5kg 左右的重物，以 10×SSC 溶液吸印，维持 18~24 h[d]。也可用电转移或真空转移。

↓ O/N

ⓔ 取下尼龙膜，0.4 mol/L NaOH 处理 30 s，迅速转至 0.2 mol/L Tris · HCl (pH7.5)/2×SSC 溶液中处理 5 min。

↓

ⓕ 将膜夹于 2 层滤纸内，80℃真空干燥 2 h。

↓

ⓖ 探针制备和杂交见第十六章分子杂交部分。

a. 除步骤ⓐ、ⓑ外，其余均在摇床上操作。

b. 有时用一种限制性内切核酸酶不能发现 RFLP 差异，这时应换用另一种限制酶。

c. 时间不能过长。

d. 当尼龙膜覆于胶上时，切记避免胶与膜间产生气泡，加盖滤膜时也不应产生气泡。

3. RAPD 实例[a, b]

a. 电泳时一般 RAPD 带有 5~15 条，大小为 0.1~2.0 kb。

b. 特异性 DNA 带可以克隆转化为一个新的分子标记而被广泛应用。

Materials

(1) PCR 仪(MJ Research PTC-200)

(2) PCR 管

(3) 电泳装置

(4) 不同来源 DNA(50 ng/μL)

(5) 随机引物(10 mer)(5 μmol/L)

(6) *Taq* DNA 聚合酶

(7) 10×PCR 缓冲液

(8) $MgCl_2$ (25 mmol/L)(附录一)

(9) dNTP (每种 2.5 mmol/L)

Protocols　　　　　　　　Time：3 h

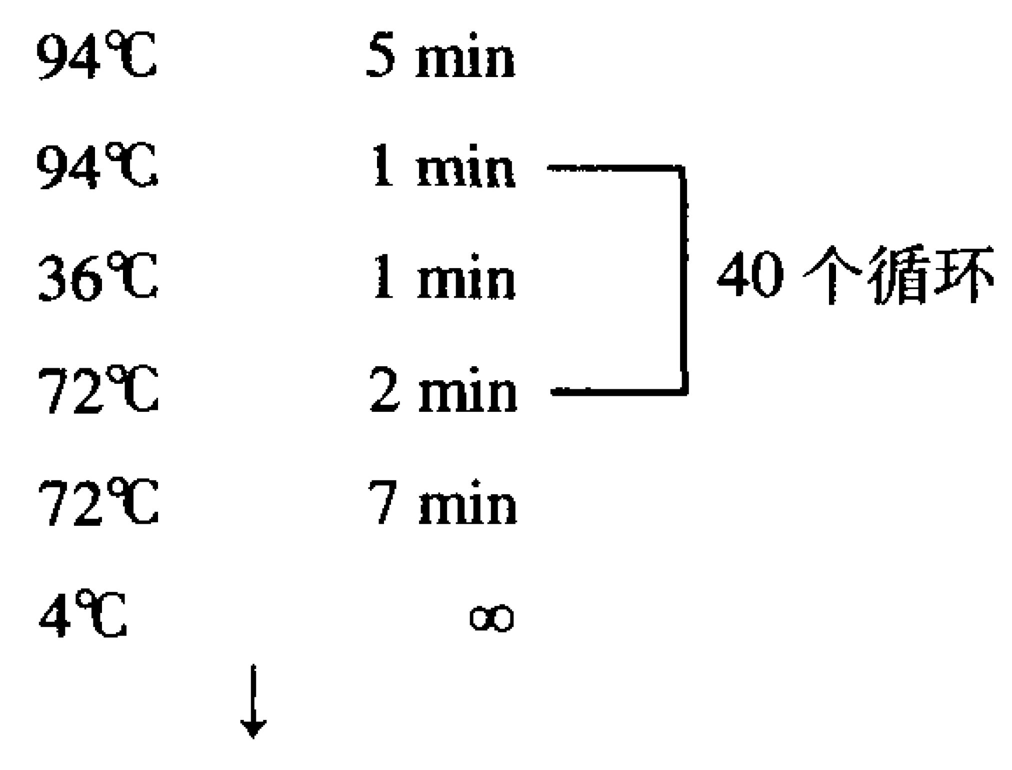
ⓐ 在 25 μL 反应体系中，加入：

模板 DNA	1 μL (20~50 ng)
随机引物	1 μL (约 5 pmol)
10×PCR 缓冲液	2.5 mL
$MgCl_2$	2 μL
dNTP	2 μL
Taq 酶	1 U

加双蒸水至总体积 25 μL

↓

ⓑ PCR 反应，标准的循环条件为：



↓

ⓒ 取 PCR 产物于 2%琼脂糖胶上电泳，稳压 50~100 V。

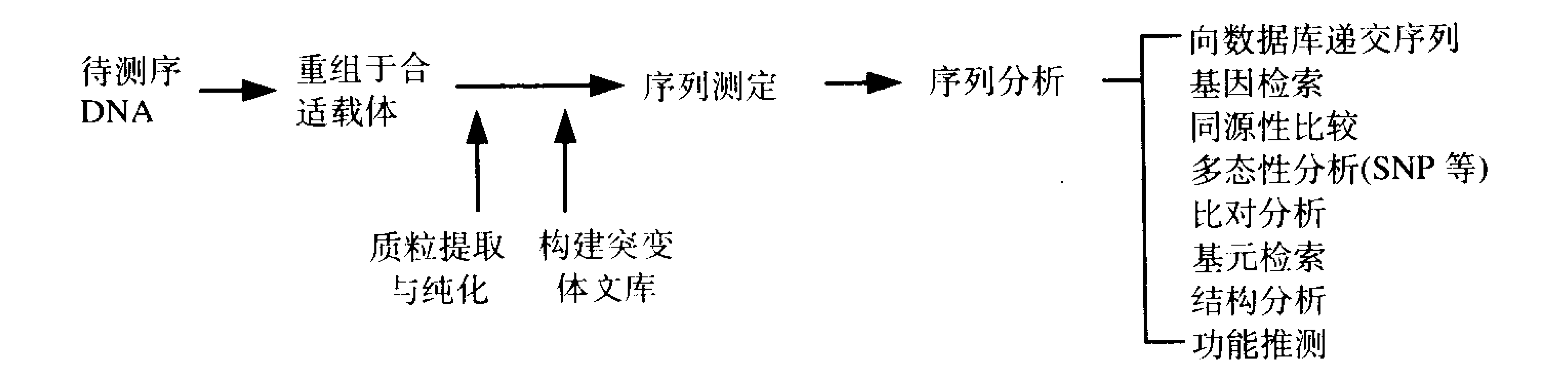
↓

ⓓ 电泳结束，观察、拍照。

Questions

1. 除本章介绍的几种分子标记外，还有哪些重要的分子标记方法?
2. 为什么能利用分子标记研究物种之间的亲缘关系?
3. 在 RAPD 中仅使用一条随机引物，为什么也能进行 PCR 扩增?
4. AFLP 标记与 RAPD 标记在原理与结果分析上有什么区别?
5. 如何将 RAPD 标记转化为稳定的 SCAR 标记?
6. 试比较你所熟悉的分子标记技术的异同。哪些标记是共显性标记?

第十八章　DNA 序列测定与比对



第一节　测 序 原 理

有两种 DNA 测序方法：双脱氧终止法和化学修饰法。

双脱氧终止法是 Sanger 于 1977 年发明的，利用 DNA 聚合酶对单链 DNA 扩增互补链的特性而设计的。由于引物只有一个，因此产物只有一条单链。又由于双脱氧核苷酸 2′, 3′ 位上均没有羟基，当其掺入到 3′端，则终止延伸反应。核苷酸有 4 种，相应的双脱氧核苷酸也有 4 种。当一个延伸反应管中加入一种双脱氧核苷酸，那么将得到一系列 5′端相同、3′端均为该双脱氧核苷酸的不同长度单链 DNA 混合物。这些混合物经高分辨率的聚丙烯酰胺变性凝胶电泳分离，可获得一系列 3′端均为该核苷酸终止碱基的电泳谱带，再结合放射自显影技术即可读出该 DNA 序列。

循环测序法作为 Sanger 法的发展，是目前最常用的测序方法(图 18-1)。与 PCR 原理相结合，反复进行“热变性-引物退火-DNA 延伸”等步骤，有以下几个优点：

(1) 可直接使用双链 DNA；

(2) 模板 DNA 使用量极少；

(3) 利用 *Taq* DNA 聚合酶，因此可用热变性法使 DNA 变性，这样 DNA 上的二级结

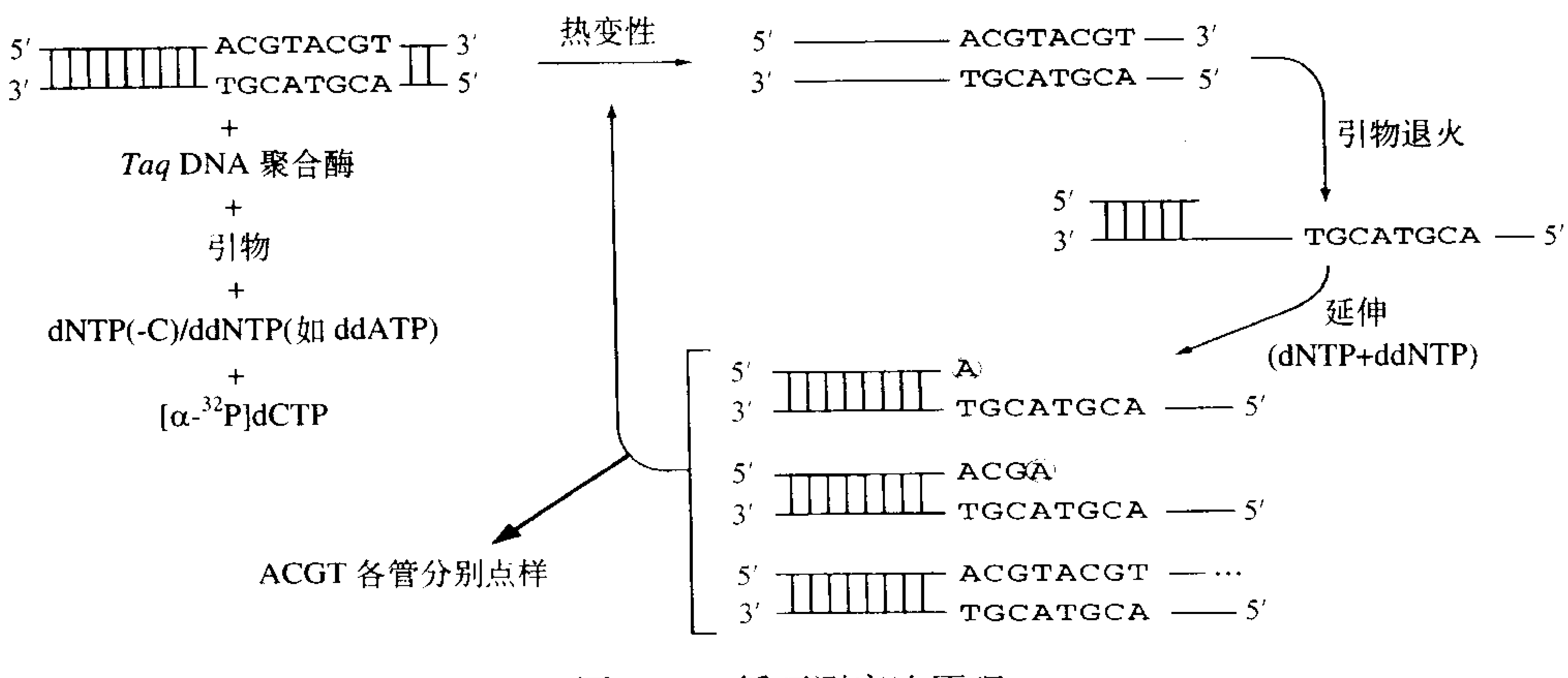


图 18-1　循环测序法原理

构不影响测序反应，广泛用于自动测序仪的测序反应。

第二节　自动测序仪

由于测序工作异常单一、繁重(特别是基因组计划的实施)，因此人们将测序工作交给机器去完成。但自动测序仪使用的 dNTP 不是用同位素标记的，而是用荧光物质进行标记。ABI 公司开发了 4 种荧光发色基团来标记 4 种双脱氧终止物，使不同长度 DNA 末端带上不同颜色。由于仅 3′端终止物带有颜色，因此当 DNA 混合物一起电泳时，在不同电泳带上表现出特定荧光，从而指示其碱基种类(图 18-2)。

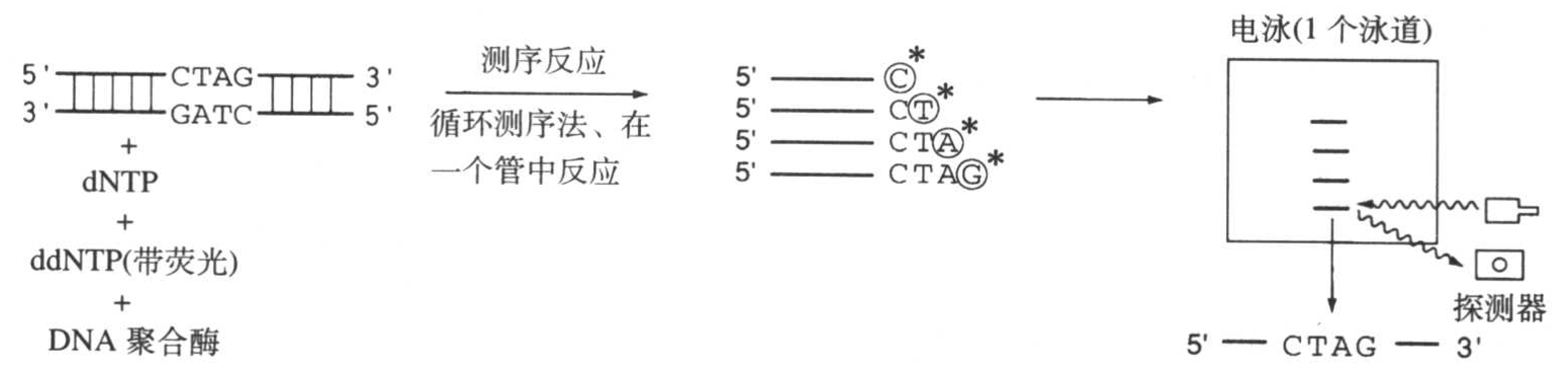


图 18-2　4 种荧光末端指示法的测序原理

ABI PRISM™ 310 测序仪将 4 种荧光标记 DNA 加样于内径 50 μm 的毛细管中进行毛细管电泳，用 CCD 探头探测荧光。由于机器可自动冲洗毛细管里上次分析用过的旧胶，并填充新胶，因此能连续做 96 个样品，而且样品上样、数据处理均自动进行，整个测序操作非常轻松，结果处理快，处理样品数多，因此该仪器已成为目前世界上主要使用的仪器之一。

Materials

(1) ABI PRISM 377 测序仪
(2) 数据收集软件 Ver 1.0.4
(3) 序列分析软件 Ver 3.3
(4) 毛细管
(5) POP 6 聚合物 [a]
(6) TSR 试剂
(7) 上样管(P/N 401957)
(8) 上样管盖(P/N 401956)
(9) 上样架(48 孔)

a. 低温保存，使用前使其升至室温。

(10) 10×流加 EDTA 测序缓冲液
(11) PCR 仪(MJ Research PTC-200)
(12) PCR 管
(13) 测序引物
(14) BigDye 测序反应试剂盒(ABI)
(15) 苯酚/氯仿/异戊醇(附录一)
(16) 3 mol/L NaAc (pH 5.2) (附录一)
(17) 预冷 100%乙醇，预冷 70%乙醇

Protocols　　Time：30 min/样品

(1) 仪器准备 [b]

b. 更详细的操作见产品使用手册。

ⓐ 打开主机。
↓
ⓑ 清洗泵区(pump-block)。

↓

ⓒ 安装毛细管。

↓

ⓓ 标定自动样品。

↓

ⓔ 填充多聚物。

↓

ⓕ 检查多聚物是否渗漏。

(2) 运行(运行之前重新启动计算机)

(3) 设置 Sample Sheet

ⓐ 打开 ABI PRISM 310 Collection。

↓

ⓑ 从 File 选择 New。

↓

ⓒ 选择 Sequence Sample Sheet 48 Tube。

↓

ⓓ 输入 Sample Sheet 的 Sample Name。

↓

ⓔ Dye Set/Primer 中选择 DT POP6(BD Set AnyPrimer)，Matrix 中选择 dRhodamine [c]。

↓

ⓕ 保存设置后，关闭。

(4) 设置 Injection List

ⓐ 从 File 中选择 New。

↓

ⓑ 点击 Sequence Injection List。

↓

ⓒ 在 Sample Sheet 的 POP 菜单中选择目的 Sample Sheet。

↓

ⓓ 在 Module 中选择 Seq POP Rapid(1 mL)E。

(5) 启动

ⓐ 提取含目的基因的重组体 DNA，并纯化。每次测序用量为 300~500 ng [d]。

↓

ⓑ 反应体系为 [e]：

质粒 DNA [f]	0.3~0.5 μg
引物(1.6 μmol/L)	1 μL
pre-mix (Kit)	3.2 μL

用无菌水定量至 8 μL

c. 不同试剂盒的选择不相同，详见试剂盒手册。

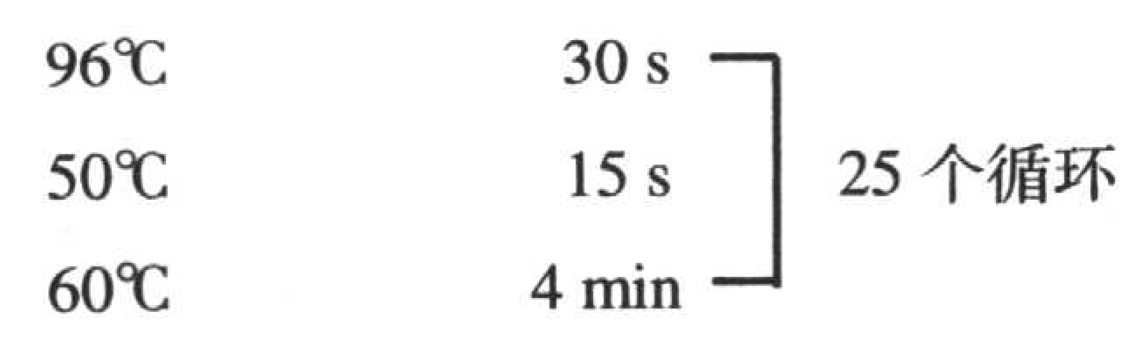
d. 模板量过多，阻碍反应延伸；过少，信号弱，按分子质量计算样品量。

e. 仅为产品手册推荐量的 40%，如果想读更长的序列，反应体积大些可能更好。

f. 可直接用质粒 DNA 作模板，但如果用单切点酶消化后再测序，结果将更理想。酶消化后应进行后续处理：Tris·酚抽提→乙醇沉淀→70% 乙醇漂洗→干燥。

↓

ⓒ PCR 仪上进行如下反应循环：



↓

ⓓ 用无菌水定容至 100 μL，再加 100 μL 苯酚/氯仿/异戊醇抽提[g]。

g. 也可不进行此步操作，但若不做的话，长度为 1~30、50~60、190~210 碱基数附近区的背景较深。

↓

ⓔ 室温、15 000 r/min 离心 3 min，上清转移至新管。

↓

ⓕ 加 10 μL 3 mol/L NaAc、250 μL 预冷乙醇后，充分混匀，−20℃静置 30 min 或−70℃静置 5 min。

↓

ⓖ 4℃、15 000 r/min 离心 10 min，弃上清。

↓

ⓗ 加 200 μL 预冷 70%乙醇，4℃、15 000 r/min 离心 2 min，弃上清，干燥沉淀。

↓

ⓘ 用 25 μL TSR 试剂溶解沉淀。

↓

ⓙ 95℃热变性 2 min 后，迅速置于冰上。

↓

ⓚ 转移至测序专用上样管中，盖上盖子。

↓

ⓛ 打开机器门，按 Tray 钮，使样品盘转动出来。

↓

ⓜ 将样品置于样品盘中，再按 Tray 钮，使样品盘自动回到原来位置。

↓

ⓝ 按 RUN 按钮。

↓

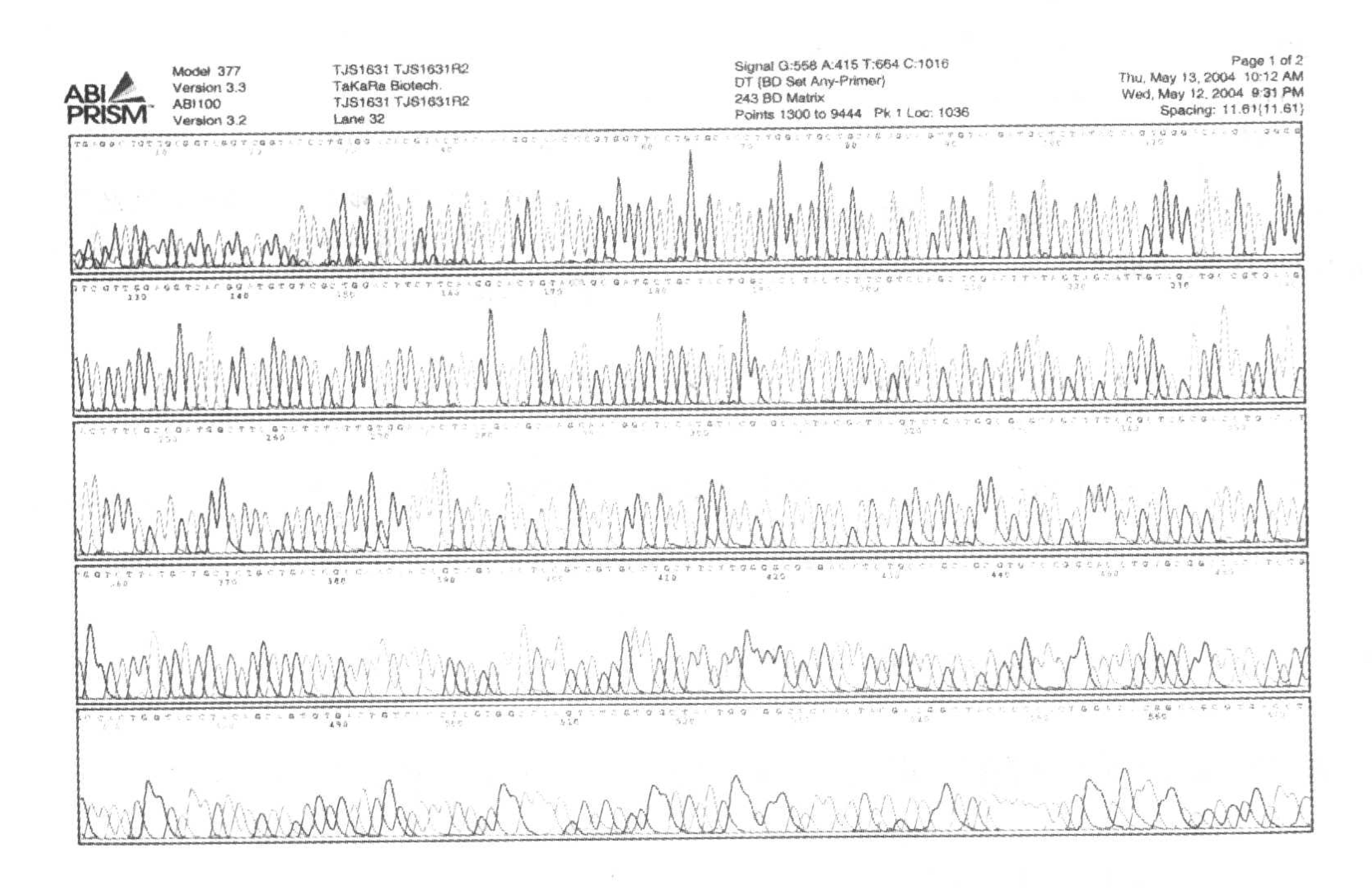
ⓞ 从 Window 菜单中选择 status，可了解运行状态(包括电压、电流、激光强度、凝胶温度等参数)，若出现异常，可终止测序。

(6) 数据处理

ⓐ 数据处理通常会自动运行，但若背景过高，Sequence Analysis 窗口则自动弹出，Sample Manager 被自动打开(若 Sample Manager 未自动打开，可从 Sequence Analysis 界面中选择 Show Sample Analysis)，可修改有关参数，完毕后，再点 Start 按钮，机器将继续运行。

↓

ⓑ 若出现理想的波形图，则可将数据打印出来或保存于盘中(下图，原图为四色图)。



(7) 数据打印或保存

ⓐ 打印：选择 Sample Manager 中的打印输出按钮，确认后点击 Start 按钮。

↓

ⓑ 保存：准备 U 盘或软盘→打开 ABI PRISM 377 文件夹→复制需要保存的文件至 U 盘或软盘。

第三节　DNA 序列的同源比对

随着基因组计划的开展，序列数据急剧膨胀起来，为便于各实验室之间进行交流，各地都建起了数据库。国际上三个主要的 DNA 序列数据库为 GenBank(www.ncbi.nlm.nih.gov)、EMBL(www.ebi.ac.nk)及 DDBJ(www.ddbj.ac.jp)。这三大数据库于 1982 年达成协议，组成合作联合体，制定了共同的录入标准，并向全世界免费共享。利用生物信息学手段可对数据库中的 DNA 及编码产物的结构与功能进行预测和比对。由美国国家生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information，NCBI)免费提供的软件 BLAST 是进行核酸序列和蛋白质序列相似性比较的优秀工具。

1. BLAST 简介

NCBI BLAST(basic local alignment search tool，局部对比基本检索工具)是将核酸序列或蛋白质序列与可用的序列数据库进行相似性比较的一系列程序，其核心程序是

BLAST210。BLAST 是一个寻找序列间相似性区段，进而比较它们之间结构和功能的工具，而不是仅仅比较整个序列的同源性。BLAST 的应用范围相当广泛，适用于核酸或蛋白质序列与可用的序列数据库之间的比较，也可用于几种序列间的比较：核酸-核酸、核酸-蛋白质、蛋白质-蛋白质。NCBI 的 BLAST 提供了网页、电子邮件以及 FTP 三种方式进行序列分析，使用十分方便。

2. 各种 BLAST 介绍

BLAST 经过不断发展完善，有以下几种类型：

1) Nucleotide BLAST

输入核酸序列，将其与其他核酸序列进行比较。

A) Standard nucleotide-nucleotide BLAST(**标准核酸-核酸** BLAST)

以三种格式(FASTA 格式、GenBank Accession 编码或 GI 编码)的核酸序列与 NCBI 核酸序列数据库进行比较。

B) MEGABLAST

该程序使用“模糊算法”加快了比较速度，可以快速比较。

C) Search for short，nearly exact sequences(**近似的短序列检索**)

该检索和带有默认参数的 Standard nucleotide-nucleotide BLAST 很相似，是对短序列进行检索。

2) Protein BLAST

输入蛋白质序列，将其与其他蛋白质序列进行比较。

A) Standard protein-protein BLAST(**标准蛋白质-蛋白质** BLAST)

以三种格式(FASTA 格式、GenBank Accession 编码或 GI 编码)的蛋白质序列与 NCBI 蛋白质序列数据库进行比较。

B) PSI-BLAST(position specific iterative BLAST，**特别位置重复** BLAST)

使用多次检索方式。第一次检索为第二次检索建立一个评分模型，保守度高位置得高分数，保守度低位置得分趋于零。这个过程被重复多次，同时不断修正评分结果，这种重复检索方法提高了精确度。

C) PHI-BLAST(pattern hit iterative BLAST，**模型位置重复** BLAST)

以常规的表达模型为特别位置进行 PHI-BLAST 检索，找出和待查询序列具有一样的表达模型且具有同源性的蛋白质序列。

D) Search for short，nearly exact sequences (**近似的短序列检索**)

该检索与带有默认参数的 Standard protein-protein BLAST 很相似，是对短序列进行检索。

3) Translating BLAST

先将待查询序列和序列数据库从核酸序列翻译成蛋白质序列，从而在蛋白质-核酸之间进行比较。

A) Translated query-Protein db [blastx]

先将待查询的核酸序列按 6 种可读框翻译成蛋白质序列，然后将翻译出的蛋白质序列与 NCBI 蛋白质序列数据库比较。

B) Protein query-Translated db [tblastn]

先将核酸序列数据库中的核酸序列按 6 种可读框翻译成蛋白质序列，然后将待查询的蛋白质序列与翻译结果进行比较。

C) Translated query-Translated db [tblastx]

先将待查询的核酸序列和核酸序列数据库中的核酸序列按 6 种可读框翻译成蛋白质序列，然后再将两种翻译结果在蛋白质水平上进行比较。

D) CD-Search

使用 RPS-BLAST 程序，对一个蛋白质序列与保守结构域数据库(conserved domain database)进行比较。

E) Pairwise BLAST

用 BLAST 程序实现两个序列之间的比较。选择“序列 1”为待比较序列，“序列 2”则是被比较的序列。下面是程序选择：

blastn：用于核酸-核酸比较；

blastp：用于蛋白质-蛋白质比较；

tblastn：先将核酸序列按 6 种可读框翻译成蛋白质序列，然后将待比较的蛋白质序列与翻译结果进行比较；

blastx：核酸序列与蛋白质序列比较；

tblastx：先将待比较的核酸序列和被比较的核酸序列按 6 种可读框翻译成蛋白质序列，然后再将两种翻译结果在蛋白质水平上比较。

F) Specialized BLAST pages

对特殊生物或特殊研究领域的序列数据库进行检索。

3. BLAST 使用实例

用一个已知的核酸序列，对 nr 数据库(所有无冗余的 GenBank + EMBL + DDBJ + PDB 序列，不包括 STS、GSS 或 HTGS 序列)进行检索。

打开 NCBI BLAST 网页，点击 Nucleotide-nucleotide BLAST(blastn，见步骤©)，出现一个对话框，在“search”右侧的文本框中写入待检索的核酸序列，点击 BLAST 按钮。出现一个新的对话框，表示检索结果，点击“Format”按钮，可以看到 ID 内容，即检索结果。这是最基本的一种检索方法，可以根据自己的需要，进一步设置不同参数，如果不知道某参数的意义，可以直接点击该参数名称获得帮助。

Materials

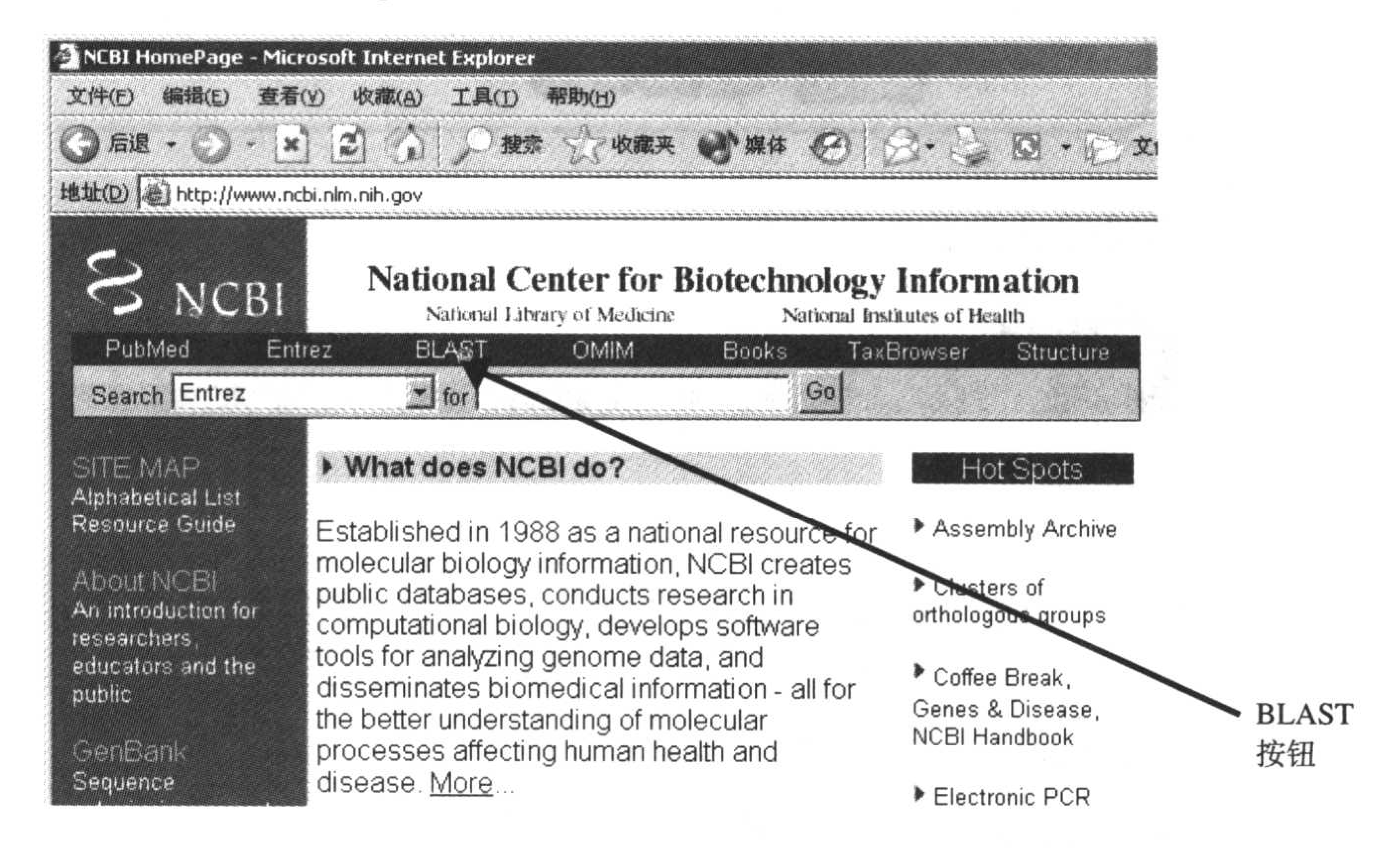
(1) 连接网络的计算机　　(2) 待比对的 DNA 序列

Protocols　　Time：30 min

ⓐ 启动计算机，连接网络。

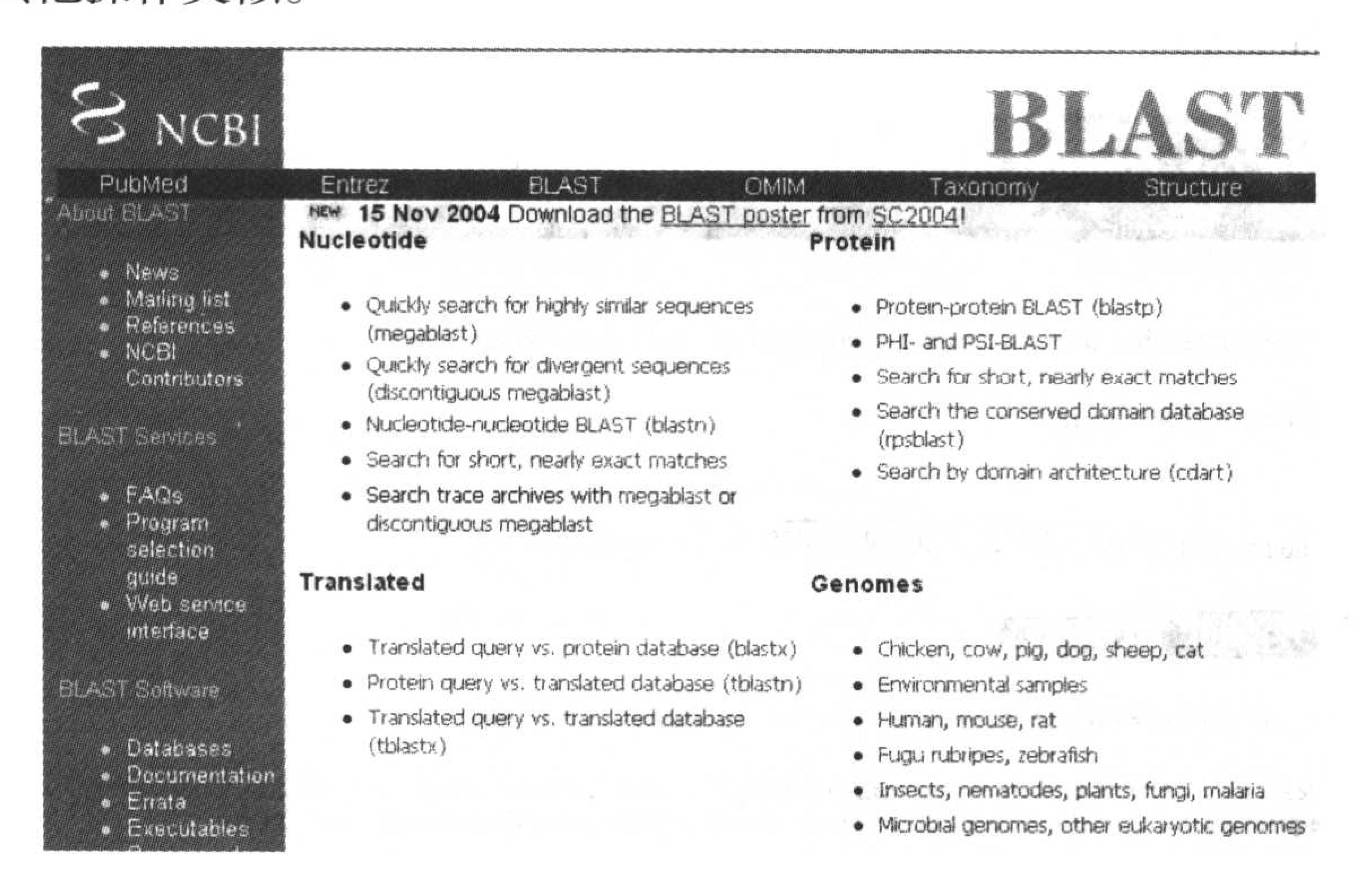
↓

ⓑ 打开 http://www.ncbi.nlm.nih.gov 界面。



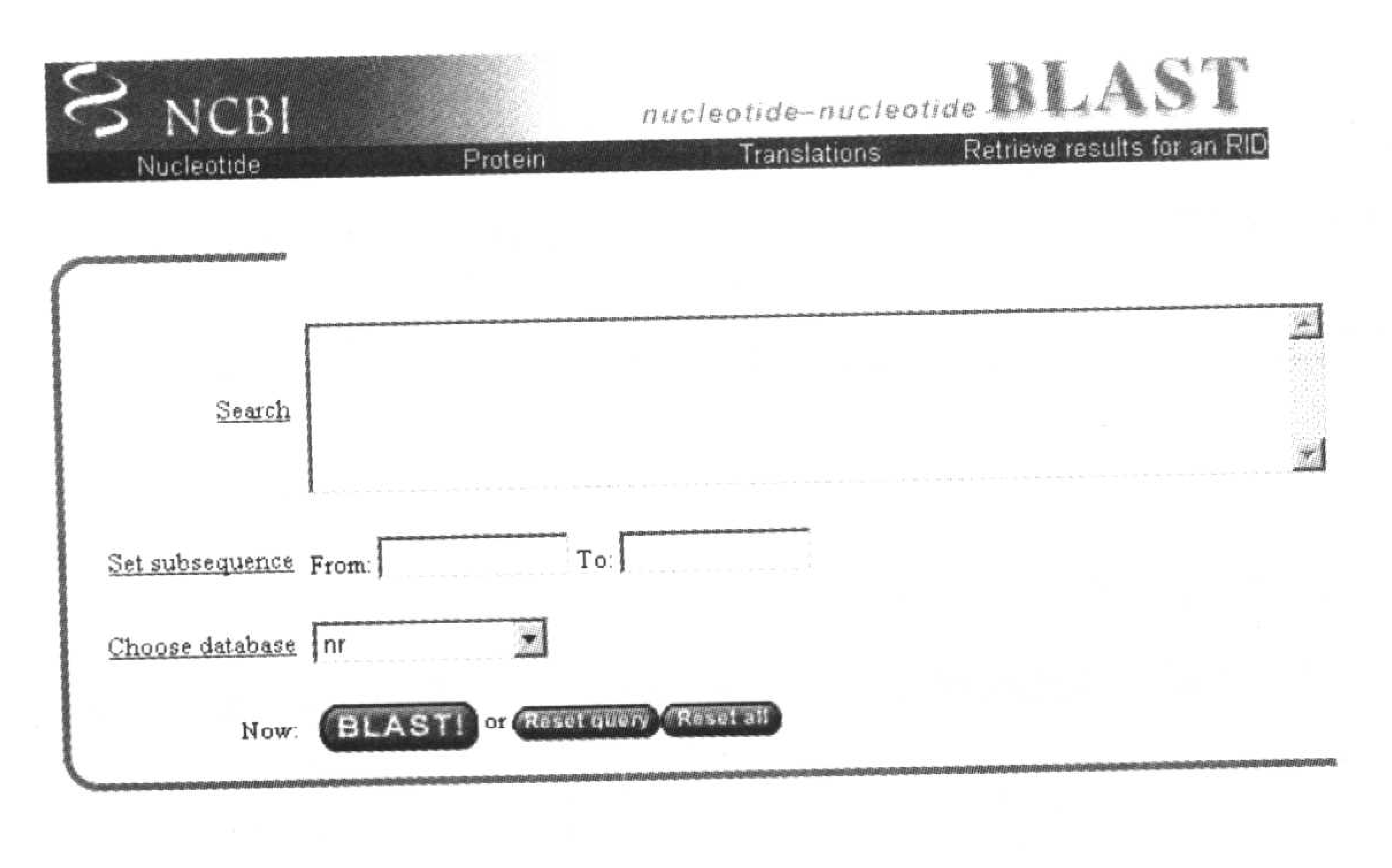
↓

ⓒ 点击BLAST按钮。界面将出现许多功能按钮，下面以Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn)为例说明，其他操作类似。



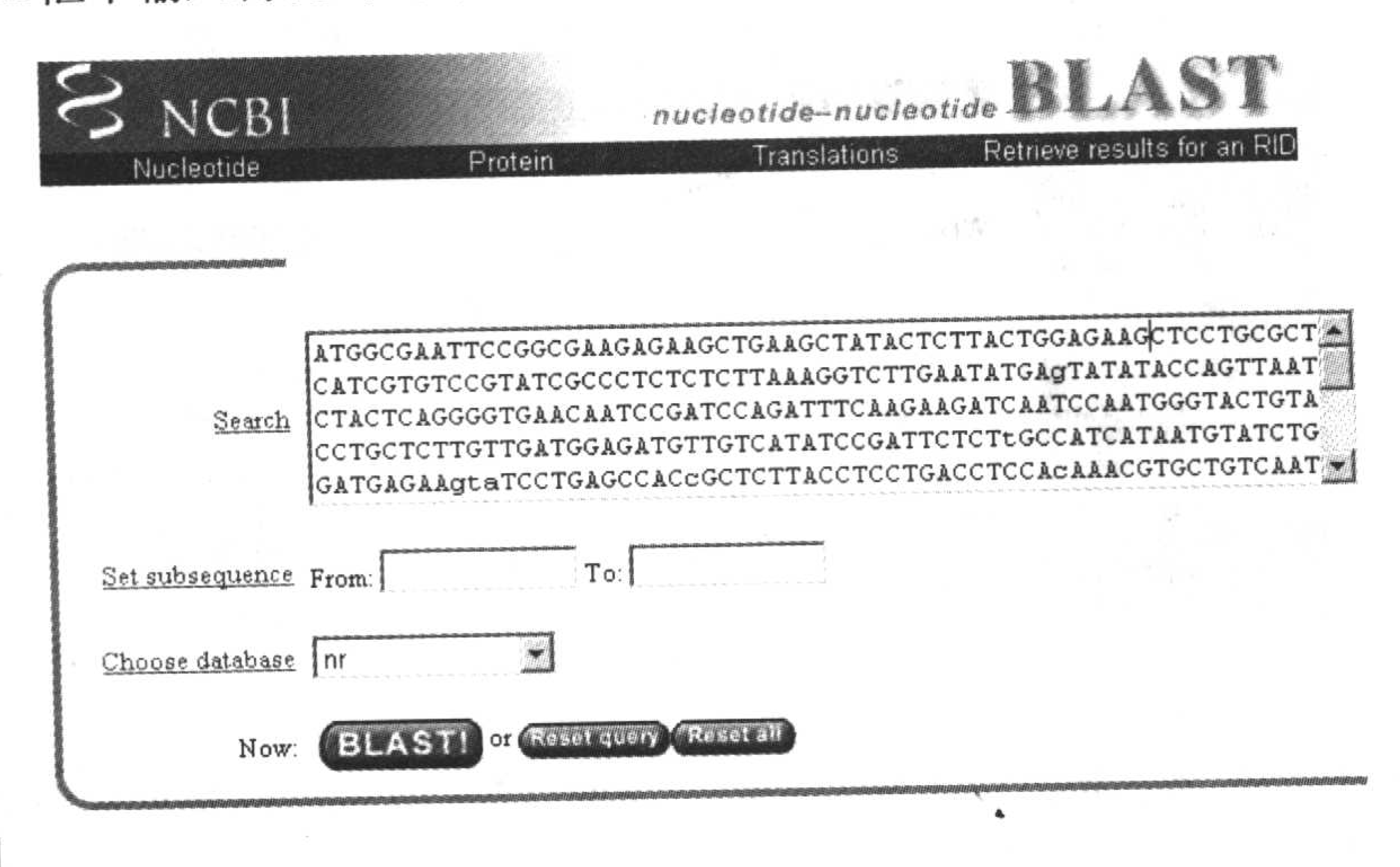
↓

ⓓ 点击 Nucleotide-nucleotide BLAST(blastn)。



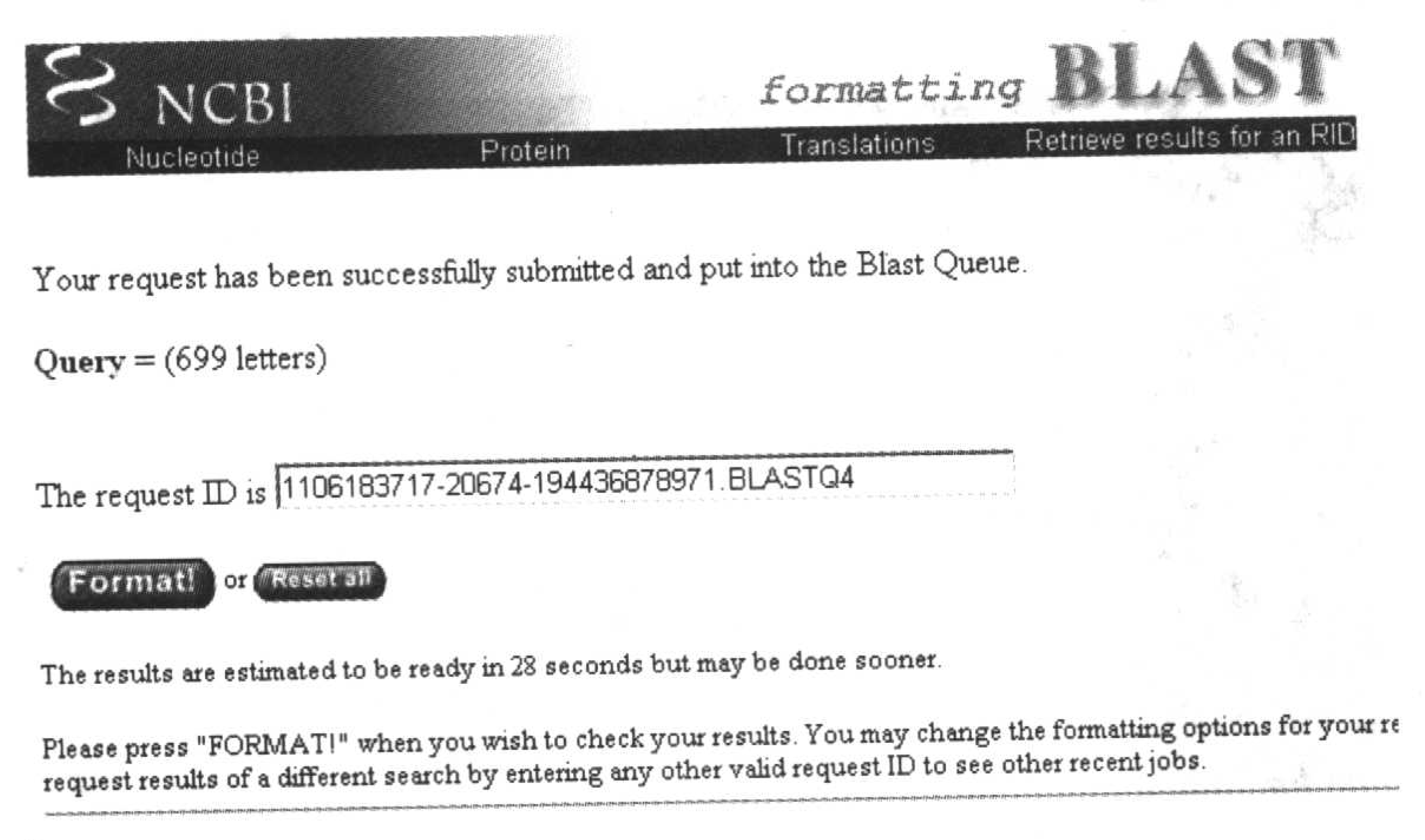
↓

ⓔ 在 Search 框中输入待比对的序列。



↓

ⓕ 点击 BLAST 按钮。



↓

ⓖ 点击 Format！按钮。页面显示与输入序列相关的所有已注册的基因序列及同源性分析结果。点击你感兴趣的，就会显示该序列详细信息。

```
                                                                  Score    E
Sequences producing significant alignments:                       (bits)  Value

gi|28932697|gb|AY208158.1|   Brassica napus cultivar Keng C1 ...   1136    0.0
gi|28932695|gb|AY208157.1|   Brassica napus cultivar Shan 2B ...   1092    0.0
gi|28932693|gb|AY208156.1|   Brassica napus cultivar Shan 2A ...   1092    0.0
gi|42467598|emb|BX820602.1|CNS0A8NX  Arabidopsis thaliana Fu...     688    0.0    U
gi|28932691|gb|AY208155.1|   Arabidopsis thaliana glutathione...    688    0.0    G U E
gi|16974448|gb|AY061901.1|   Arabidopsis thaliana At2g02390/T...    688    0.0    G U
gi|15450462|gb|AY052332.1|   Arabidopsis thaliana At2g02390/T...    688    0.0    G U
gi|11095997|gb|AF288182.1|AF288182  Arabidopsis thaliana chr...     688    0.0    G U
gi|30677993|ref|NM_126296.2|  Arabidopsis thaliana glutathio...     688    0.0    G U E
gi|11967658|emb|AJ278293.1|ATH278293  Arabidopsis thaliana m...     680    0.0    G U
gi|42467807|emb|BX821880.1|CNS0A8BI  Arabidopsis thaliana Fu...     593    e-166  U
gi|42570266|ref|NM_179595.2|  Arabidopsis thaliana glutathio...     585    e-164  G U
gi|42570652|ref|NM_201671.1|  Arabidopsis thaliana glutathio...     525    e-146  G U
gi|18395358|ref|NM_126295.1|  Arabidopsis thaliana glutathio...     494    e-136  G E
gi|20197334|gb|AC005312.3|   Arabidopsis thaliana chromosome ...    129    1e-26  E
gi|29420154|gb|AY206003.1|   Malva pusilla glutathione S-tran...     68    3e-08
gi|24061761|gb|AY143431.1|   Capsicum annuum clone CUKM3 glut...     66    1e-07
gi|47104443|gb|BT013028.1|   Lycopersicon esculentum clone 11...     44    0.45   U
gi|11385486|gb|AF244683.1|AF244683  Zea mays glutathione S-t...      44    0.45   U
gi|488197|gb|U00064.1|  Caenorhabditis elegans cosmid ZC155          42    1.8
```

…Tips………………

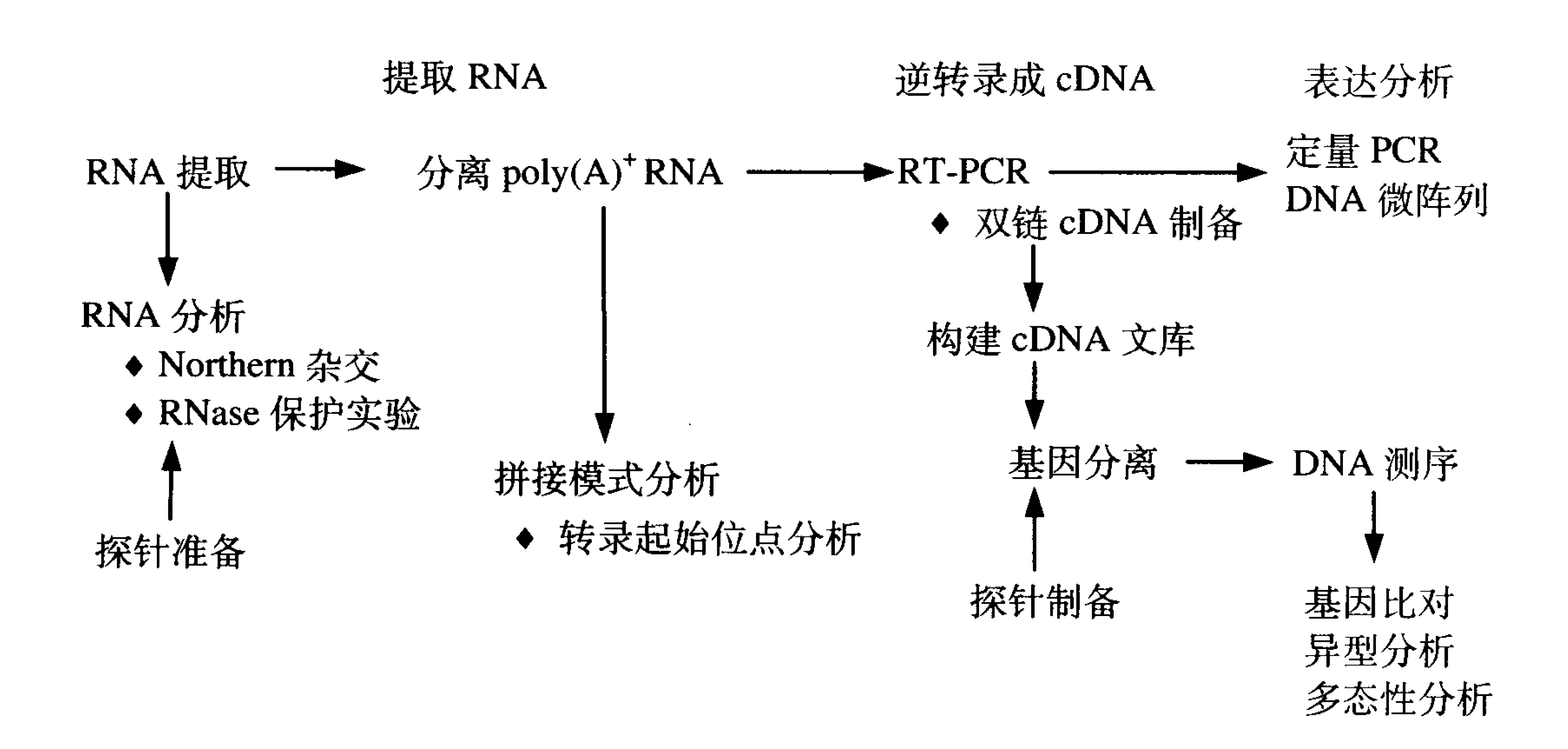
经常使用的数据库有 GenBank、DDBJ、EMBL、SwissProt 等，它们间经常交换数据，在任一数据库中比对数据，结果是相同的。SwissProt 是以 GenBank、DDBJ、EMBL 数据库为基础建立的蛋白质数据库。数据库名及简写：

gb：genbank (Genbank nucleic acid sequence database)
emb：embl (EMBL nucleic acid sequence database)
dbest：dbest (dbEST database of Expressed Sequence Tags)
gbu：embl-upd (Cumulative daily updates of Genbank since the latest release)
embu：embl-upd (Cumulative daily updates of EMBL since the latest release)
pir：pir (PIR protein sequence database)
sp：swissprot (SWISS-PROT protein sequence database)
prf：prf (PRF protein sequence database)
gp：genpept (Translated protein sequences from Genbank)
str：pdbstr (Re-organized Protein Data Bank)
spu：Swissprot-upd (Cumulative daily updates of SWISS-PROT since the latest release)
gpu：genpept-upd (Translated protein sequences from Genbank-upd)
stru：pdbst-upd (Cumulative daily updates of PDBSTR since the latest release)

…Questions………………

1. 简述双脱氧法测序的基本原理。如何根据最后的电泳结果推测 DNA 序列？
2. 测序用的 DNA 在纯度上有什么要求？如何保证其达到理想的纯度？
3. 自动测序仪每次只能测得约 500 bp 的序列，如何完成 1800 bp 序列的测定工作，并将其组装成全序列？
4. 如何确定你所得序列为新序列？
5. 如何分析你所得序列中是否有完整的可读框？其可能表达的蛋白质是否为你所预期？如何证明你的分析？
6. 如何研究待分析基因与其他物种的类似基因有亲缘关系？

第三篇　RNA 篇



提取 RNA
逆转录成 cDNA
表达分析
RNA 提取
分离 poly(A)+ RNA
RT-PCR
定量 PCR
DNA 微阵列
◆ 双链 cDNA 制备
RNA 分析
◆ Northern 杂交
◆ RNase 保护实验
构建 cDNA 文库
拼接模式分析
◆ 转录起始位点分析
基因分离
DNA 测序
探针准备
探针制备
基因比对
异型分析
多态性分析

第十九章　RNA 提取

目的基因转录成 RNA 后才开始发挥其作用，因此人们对 RNA 的研究逐渐增多起来。在后基因组时代，人们的兴趣已转移到基因组多态性与疾病相关性和基因表达与表型关系上，这些问题的阐明对了解基因控制的生命现象具有非常重要的意义。为此，本章主要介绍 RNA 研究方法及实验过程中的注意事项。

第一节　RNA 实验前的准备

1. 了解 RNA 特征

RNA 是单链分子，由 A、U、C、G 四个碱基串联在核糖-磷酸骨架上而成多核苷酸链。由于核糖 2′ 位是—OH，遇水易发生变构，使其结构很不稳定，这种不稳定的变构反应在碱性条件下被加快。因此，RNA 的长期保存是一件头疼的工作。不合适的缓冲液将大大缩短保存时间，RNA 完整性也将受到严重破坏。

细胞内外存在大量 RNA 酶(RNase)，对 RNA 产生降解反应，而且该酶极稳定，因此在 RNA 提取与分析相关实验中，如何避免 RNase 污染是一件非常重要的工作。

RNA 为单链分子，但在合适条件下易出现分子内局部配对，这种配对导致 RNA 分子形状发生改变，因而在普通电泳中不能正确显示其大小。因此，为显示其正确的分子大小，应使用变性胶电泳，利用变性剂破坏其内部配对，使 RNA 表现为完整的单链状态。

在 pH6.0 微酸性环境下 RNA 相对稳定，碱性环境下易分解。

2. 树立 RNase-free 思想

从前面所介绍的 RNA 特征可知，RNA 极易降解，细胞内外存在大量的、稳定性极高的 RNA 酶。因此，在 RNA 相关实验中始终应有 RNase-free 思想。具体而言，应注意以下几点：

1) RNase 无处不在

细胞内存在大量的 RNase，裂解细胞时应特别注意。

人的体液中含有大量的 RNase，应尽量避免样品或样品管与体液的接触，养成勤换手套和口罩的习惯。

空气中的灰尘与细菌中含有大量的 RNase，应建立干净的操作环境。

2) RNase 稳定性极高

仅用蛋白质变性剂 SDS 或苯酚不能使之完全失活[a]。

a. 在 60℃高温下进行酚处理(热酚法)，能有效地使 RNase 失活，而且改善蛋白质变性效果，提高酚的分离能力。

其活性不依赖金属离子，因此 EDTA 等螯合剂不能使之失活。
热稳定，仅用煮沸方式不能使之失活。

3) 创造良好的实验环境

尽量使用一次性用品或专用品。
尽量同时使用 RNase 抑制剂。
保持实验场所、器械、试剂储存场所等的清洁，而且告知全体研究人员。

4) RNA 样品处理

RNA 样品溶于 pH6.0 的 50%乙醇溶液中，可保存于−20℃(若为水溶液，则应保存在−70℃以下的温度)。

3. 实验室与操作台面的整理

1) RNA 实验室专用试剂及器械应与其他实验用品分开保存

在实验室内设 RNA 实验专区，防止灰尘污染；只要是不昂贵的试剂或器械，应另购买一套，并准备专用试剂柜，以防灰尘污染和试剂交叉污染，戴着手套开关试剂柜门。

2) 保持操作台面的清洁

实验台面应远离他人，可选择远离实验室出入口的位置。实验台面清理后，还应铺一层铝箔纸，以确保不受 RNase 污染。实验过程中可能使用许多公共仪器，此时应尽量不要让样品管与之直接接触；若必须接触，则应对仪器进行清理，并在接触面上铺一层铝箔纸。如用天平称样，应先对天平周围进行清理，并在天平盛物皿上铺一层铝箔纸，再对样品进行称量。实验过程中可能使用无盖的容器(如烧杯)，使用时尽量用铝箔纸盖上，以防污染物落入(图 19-1)。

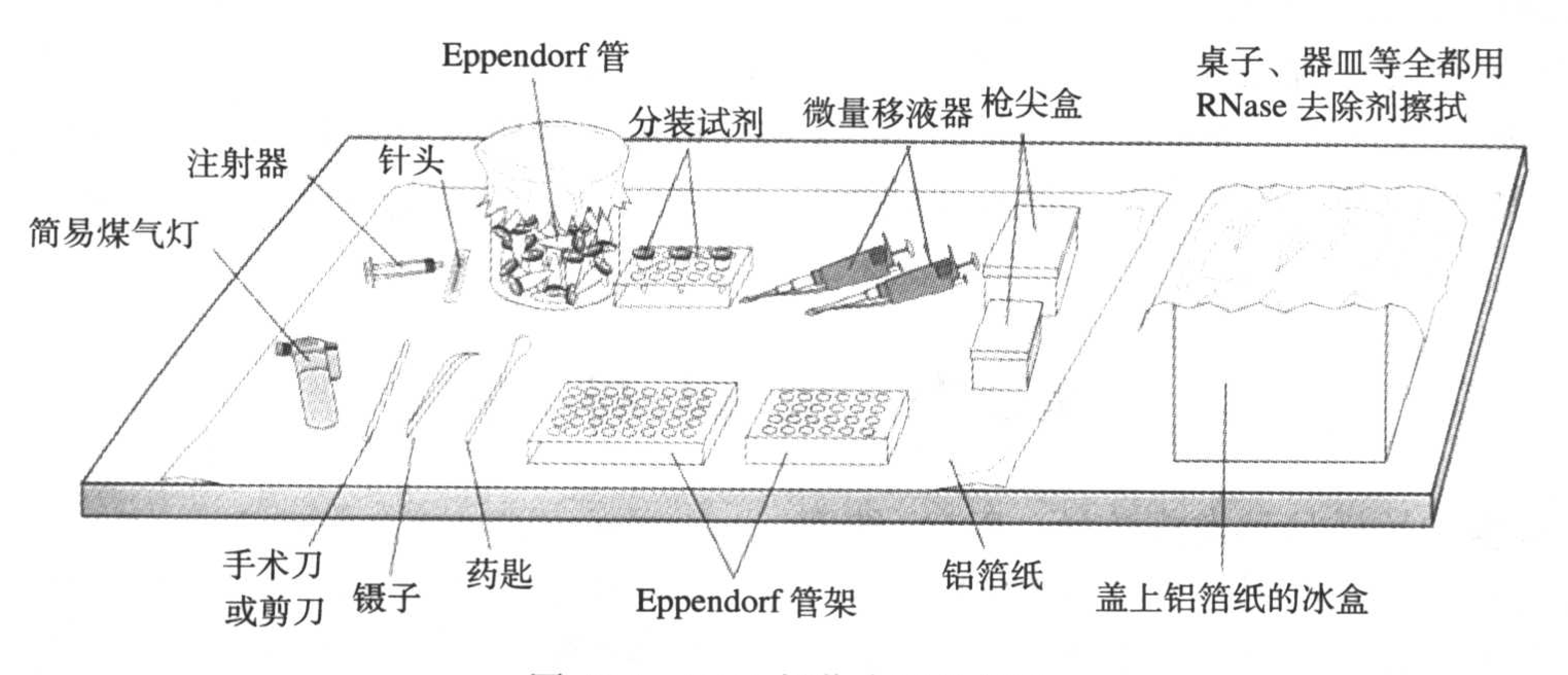


图 19-1　RNA 操作台面的布置

4. 器皿与试剂的准备

1) RNase 去除剂

RNase 在强碱性条件下易失活，利用该性质而生产的 RNase 去除剂已有销售。如 Dupout 公司的 Absolve，工作浓度为 2%，用于玻璃器皿、塑料制品等难洗净器皿的洗涤。浸泡过夜后，用水充分涮洗，再用无菌水漂洗，然后干燥。

2) 干热灭菌

用于玻璃器皿、金属及耐 250℃物品的灭菌。用 RNase 去除剂洗涤后，包于铝箔纸内，180~200℃烤箱中灭菌 4 h 以上。

3) 高温高压灭菌

用于一次性使用的塑料制品的灭菌。如 Eppendorf 管及枪尖等。用铝箔纸包起来进行高温高压灭菌，灭菌时间约 1~2 h。无菌水的灭菌也用此方法，但盛水的玻璃器皿应事先经干热灭菌。

4) 水溶液及试剂的配制

用上述方法准备的药匙取样称量，盛于干热灭菌的玻璃容器内，用上述准备的灭菌水进行定量，再用铝箔纸密封瓶口进行高温高压灭菌。待自然冷却至室温后，置于指定场所备用。不能高温高压灭菌的试剂在配制后过滤灭菌。有机溶剂可直接使用，但应使用高纯度专用品。

5) DEPC 处理水[a]

用于配制一些特殊需要的试剂，如 70%乙醇、0.5% SDS 溶液等不能经高温高压灭菌的溶液。DEPC 是 diethylpyrocarbonate(焦碳酸二乙酯)的简写，是一种蛋白质强变性剂，具有强芳香性，易挥发，对人体有致癌作用，使用时应特别注意，宜在通风橱内操作。用灭菌水配成 0.1%浓度，室温或 37℃下放置 12 h 以上，然后打开瓶口高温高压灭菌 20 min(2 次)，以除去残留的 DEPC。由于残留的 DEPC 会抑制酶促反应，因此，应彻底除净残留的 DEPC。是否除净，看处理水中是否残留芳香味。

a. 由于 DEPC 会与 Tris 发生化学反应而失效，因此，不能用 DEPC 处理含 Tris 的溶液。这点应特别注意。

第二节 实验材料

根据初始样品种类或数量、RNA 纯度、操作简易程度的不同，可以将 RNA 提取方法划分为多种(图 19-2)。本章介绍 3 种方法：AGPC 法、NP-40 法和试剂盒法，其中试剂盒法最简单，提取的 RNA 纯度也最高[a]。

a. 检测 RNA 质量的方法：
- 测吸光度。A_{260}/A_{280} 应在 1.8~2.0 范围内。
- 电泳图谱。28 S 和 18 S 条带清晰、28 S 亮度是 18 S 的 2 倍以上。
- 保温实验。70℃保温 1 h，确认 RNA 没有新的降解，则表明溶液中没有 RNA 酶。

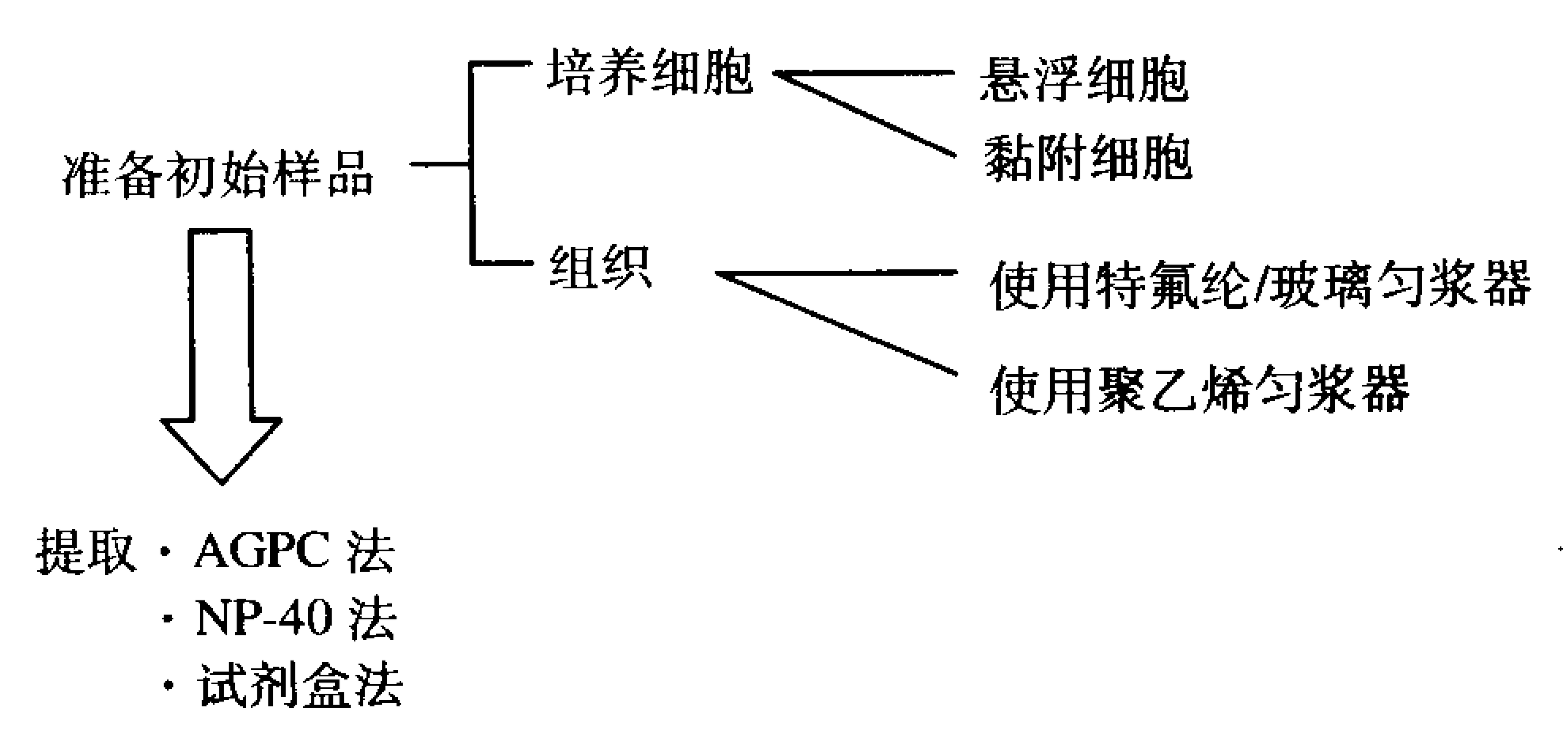


图 19-2　RNA 提取流程

1. 初始样品的准备

细胞破坏后，细胞内源 RNase 将对 RNA 产生降解。因此，细胞或组织的变性、溶解等操作是 RNA 提取的关键步骤。

2. 破碎培养细胞

Materials

(1) 真空泵

(2) 微量移液器

(3) 低温离心机

(4) 注射器

(5) 针头

(6) 刮刀(仅用于黏附细胞材料)

(7) 10×PBS 缓冲液(附录一)

(8) 变性液：GTC 或裂解缓冲液(见 AGPC 法或 NP-40 法)

Protocols　　Time：30 min

(1) 从悬浮细胞制备匀浆物(图 19-3)

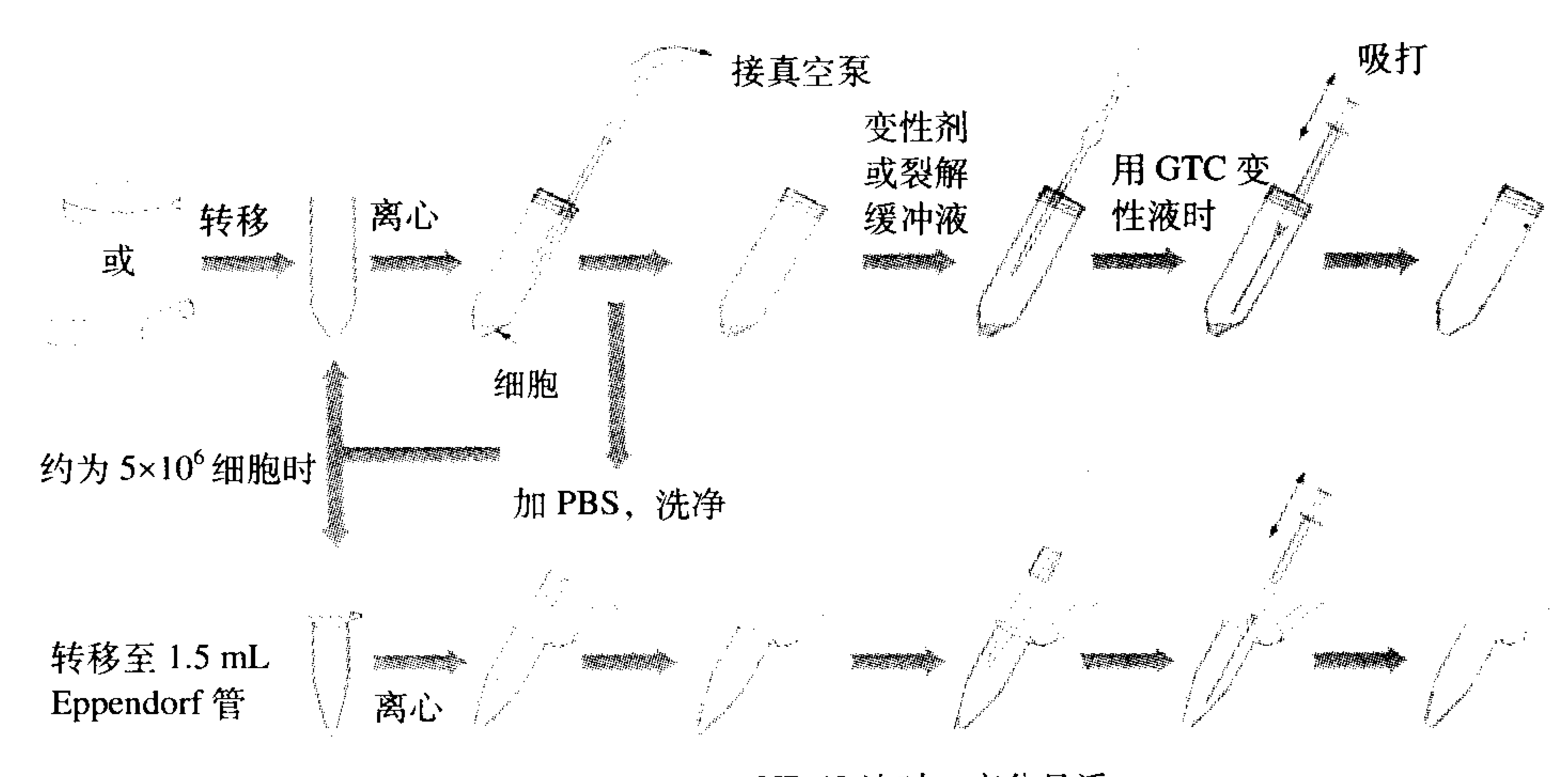


图 19-3　从悬浮细胞中制备匀浆物

ⓐ 将培养物转移至 15 mL 或 50 mL 离心管中。

↓

ⓑ 4℃、800 *g* 离心 5 min。

↓

ⓒ 弃上清，加 10 倍细胞体积的预冷 1×PBS，轻轻吸打混匀，注意防止气泡产生。

↓

ⓓ 4℃、800 *g* 再离心 5 min。

↓

ⓔ 按ⓒ、ⓓ步骤再操作一次[a]。

↓

ⓕ 弃上清。

↓

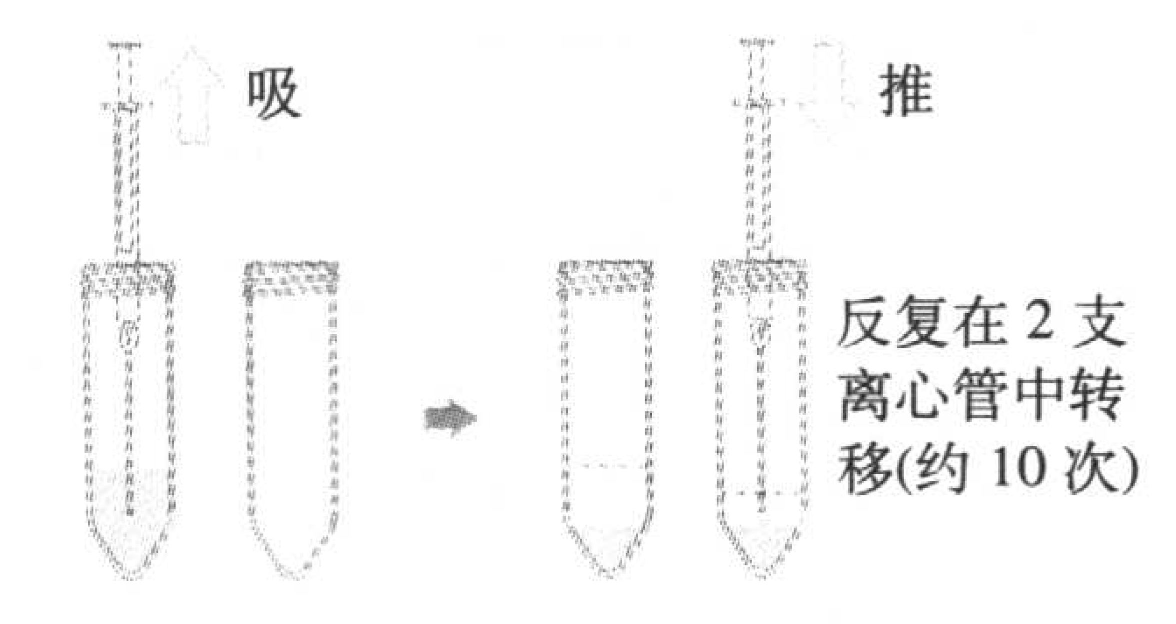
ⓖ 立即加 5 倍细胞体积的变性剂(NP-40 法为裂解缓冲液)。

↓

ⓗ 若是含 GTP 的变性剂，基因组 DNA 则使溶液黏稠，因此，应使用 20~21号针头吸打溶液十几次以剪碎基因组 DNA[b]。

a. 细胞数少时，沉淀悬浮于 1 mL PBS 中，再转移至 1.5 mL Eppendorf 管中，4℃、2000 r/min 离心 3 min 以收集细胞。

b. 吸打不能过头，否则 DNA 剪得过碎，与 RNA 一起提取出来而污染 RNA 样品。



(2) 用黏附细胞制备匀浆物

A. 在培养皿中裂解细胞

ⓐ 弃培养皿中的培养基，然后将其置于冰上。从下一步开始，所有操作在冰上进行。

↓

ⓑ 加 5~10 mL 预冷 1×PBS。PBS 灌后，弃之。

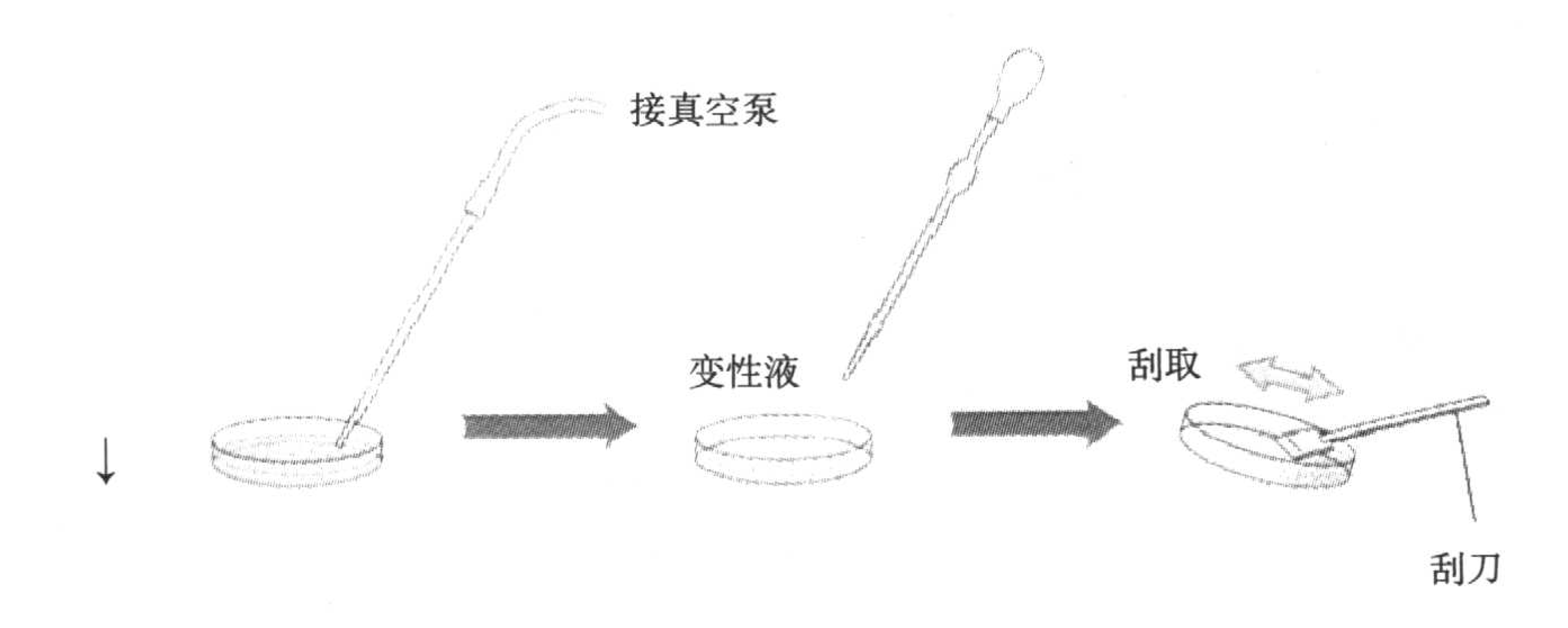
↓

ⓒ PBS 完全去净后立即加变性液[c]。

↓

ⓓ 用刮刀刮取细胞提取液，转移至离心管。

c. 合适变性液的量为 400 μL($\Phi = 6$ cm 培养皿)或 1 mL($\Phi = 9$ cm 培养皿)。



↓

ⓔ 若使用 GTP 变性剂，用 20~21号注射针剪碎基因组 DNA(参考悬浮细胞的操作方法)。

B. 细胞刮下后，在离心管内裂解细胞

ⓐ 弃培养皿中的培养基，转移至冰上，以下操作全在冰上进行。

↓

ⓑ 加 5~10 mL 预冷 1×PBS，待 PBS 充满皿底后弃之。

↓

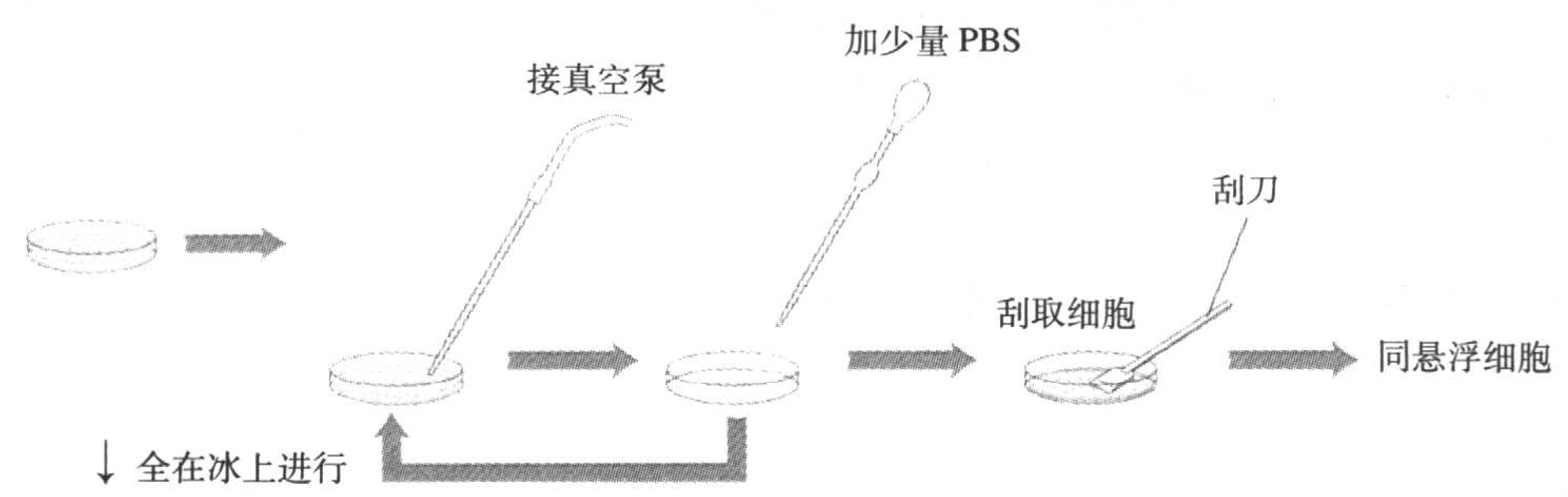
ⓒ 加 1 mL 预冷 1×PBS($\Phi = 9$ cm 培养皿)，用刮刀收集细胞。

↓

ⓓ 细胞转移至 1.5 mL Eppendorf 管中，4℃、2000 r/min 离心 3 min。

↓

ⓔ 弃上清后立即加 5 倍细胞体积的变性液(NP-40 法为裂解缓冲液)。



ⓕ 若使用 GTC 变性剂，用 20~21 号注射针剪碎基因组 DNA(参考悬浮细胞的操作方法)。

3. 组织捣碎

Materials

(1) 铝箔纸
(2) 锤子
(3) 真空泵
(4) 研钵
(5) 微量移液器
(6) 匀浆器(NP-40 法不用)
(7) 组织捣碎机
(8) 低温离心机
(9) 液氮
(10) 10×PBS 缓冲液(附录一)
(11) 变性液：GTC 液或裂解缓冲液(见 AGPC 法或 NP-40 法)

Protocols　　Time：1 h

※所有操作宜在低温室中进行。

(1) 使用特氟纶/玻璃匀浆器

ⓐ 组织取出后用液氮速冻，保存于−70℃[a]。

↓

ⓑ 在铝箔纸上，用锤子捣碎组织(见右图)。

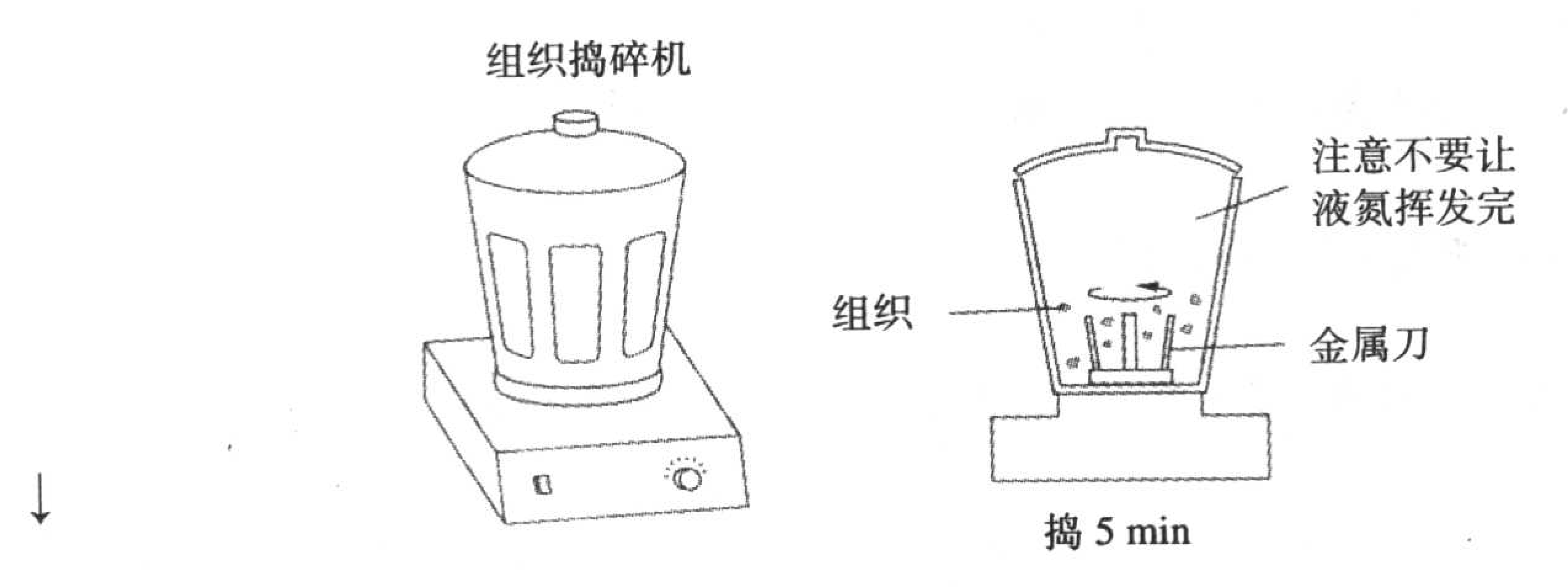
↓

ⓒ 用锤子不能破碎的组织可用组织捣碎机来破碎。在容器中灌满液氮后再放入组织材料，打开开关，使组织捣成数

a. 牛脏器等大组织切成薄片后，再进行捣碎操作。

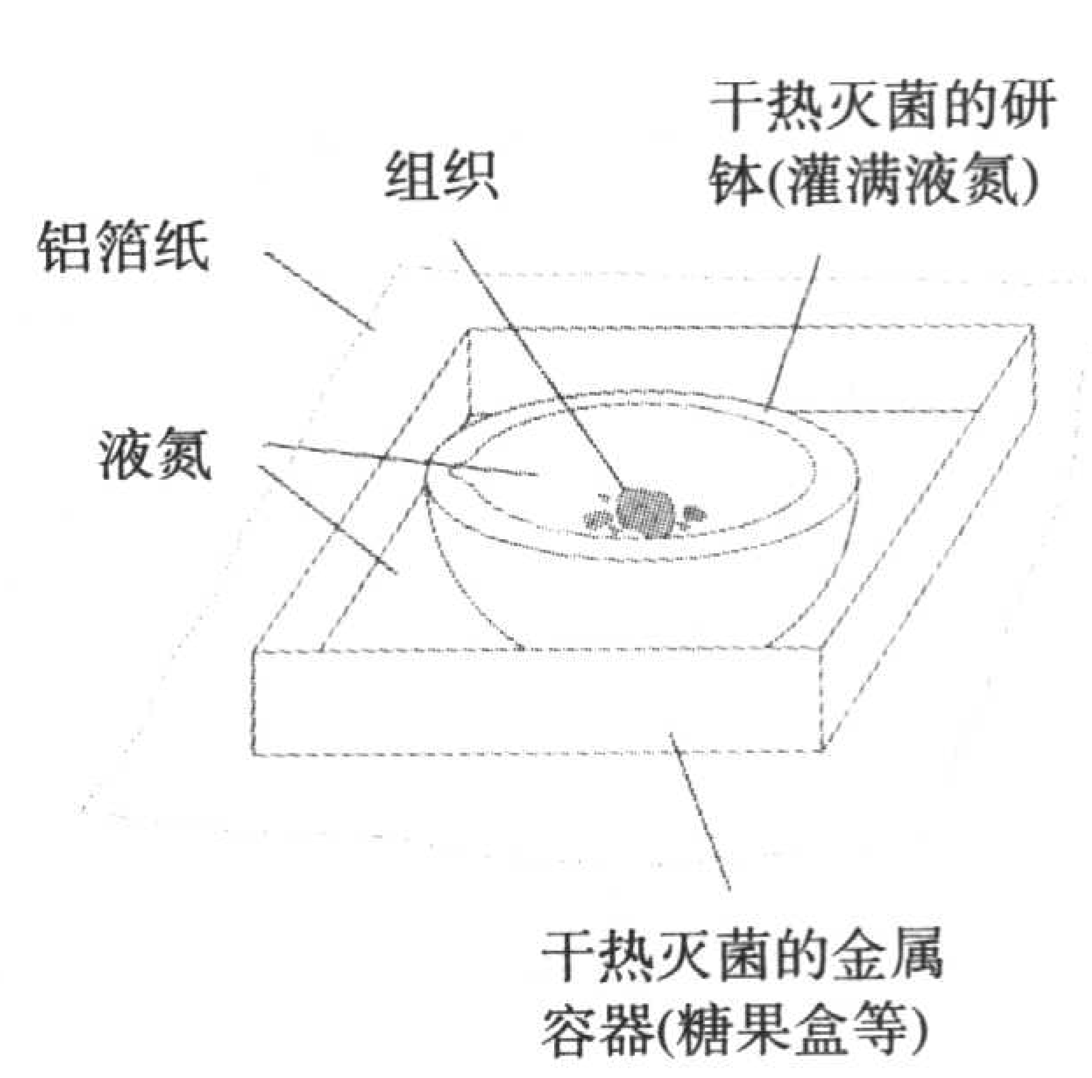


毫米厚的碎片(约 5 min)。注意不要让液氮挥发完。



↓

ⓓ 将碎小组织迅速转至灌满液氮的研钵中，研磨成粉末，称重。若用 NP-40 法提取 RNA，粉末悬浮于裂解缓冲液中，按后面介绍的 NP-40 法流程进行操作。

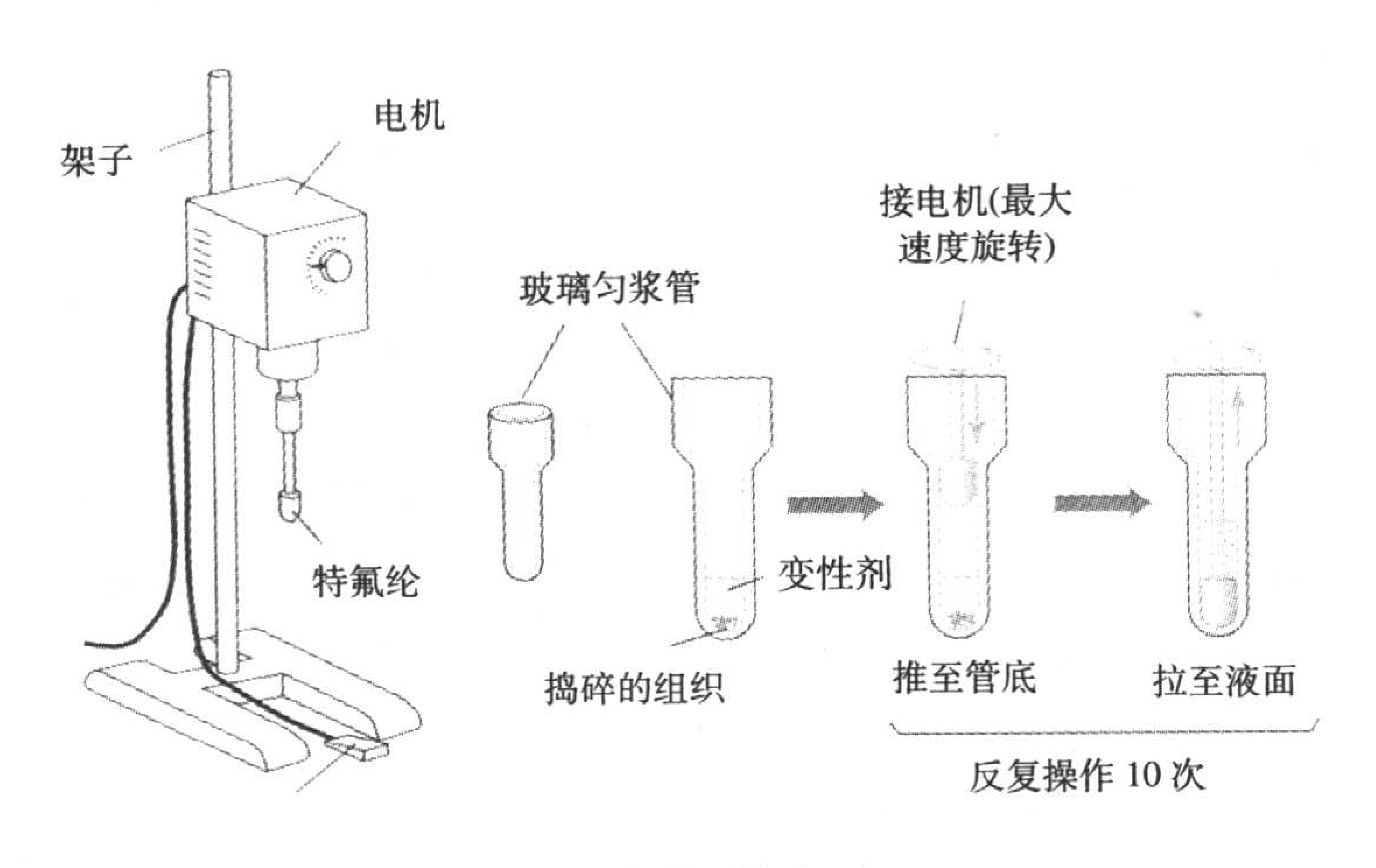


↓

ⓔ 转移至匀浆器中，每克组织加 10 mL 以上的 GTC 变性剂。

↓

ⓕ 高速转动特氟纶/玻璃匀浆器，上下匀浆 10 次左右。



↓

用特氟纶/玻璃匀浆器捣碎组织

ⓖ 待匀浆物黏稠时，用 20~21 号注射针剪碎基因组(参考悬浮细胞的操作方法)。

(2) 使用聚乙烯匀浆器[b]

b. 不可用于 NP-40 法。

ⓐ 与前法相同，速冻组织，绞碎至适当大小。

↓

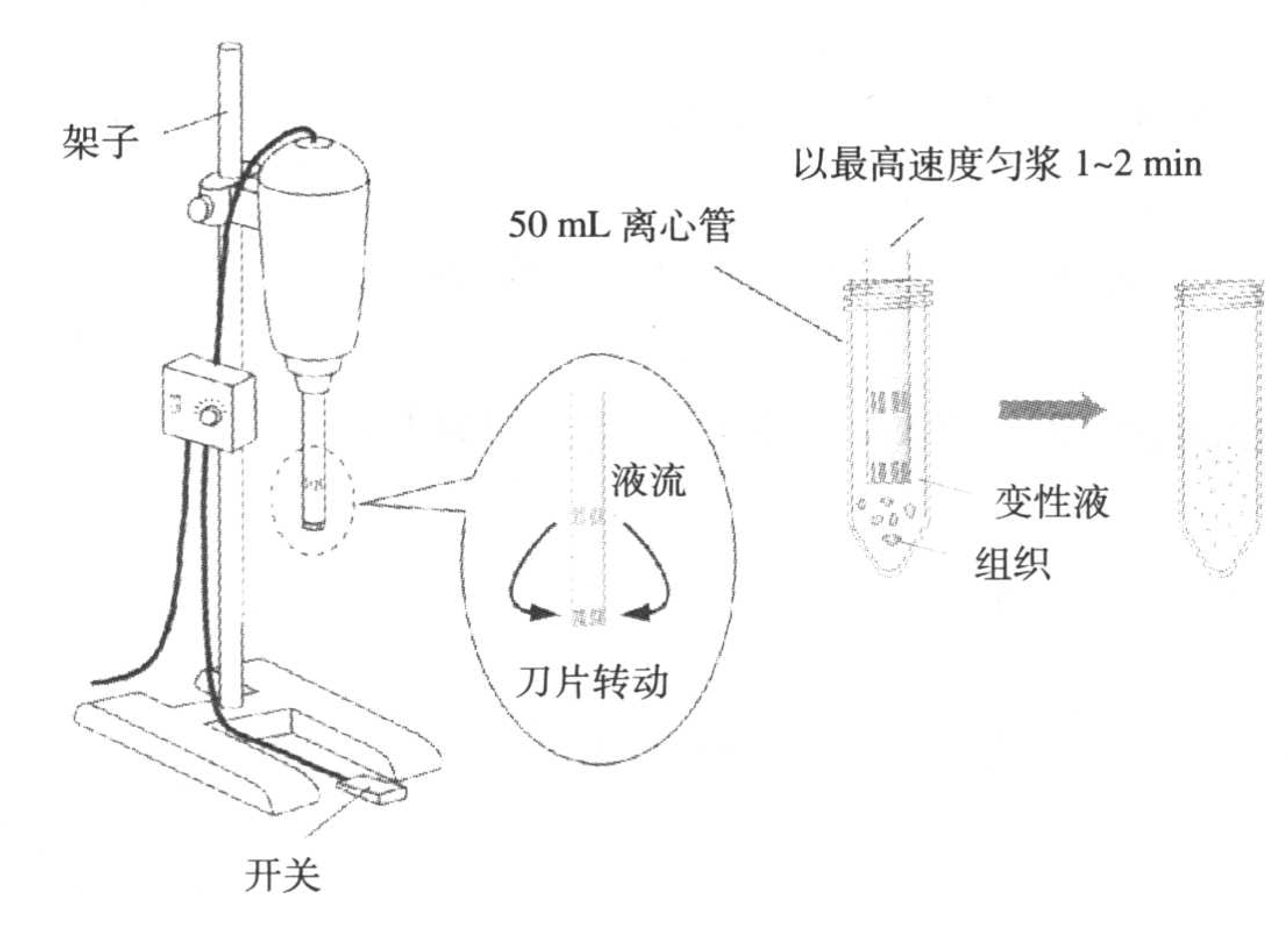
ⓑ 称量。2~3 g 以下为宜。

↓

ⓒ 转移至 50 mL 离心管，加 10 倍量变性剂。

↓

ⓓ 立即匀浆，高速匀浆 2 min。



↓

用聚乙烯匀浆器捣碎组织

ⓔ 匀浆的同时也剪碎了基因组 DNA，因此匀浆物可直接用于 RNA 提取。

第三节　用 AGPC 法提取 RNA

核酸在酸性水溶液中亲水性低，酸性酚抽提时 DNA 溶于酚相，而 RNA 溶于水相中，利用这个特性开发了 AGPC(acid-guanidine-phenol-chloroform，酸性胍-酚-氯仿)法。由于该法不用超速离心机，因此广泛用于少量 RNA 的提取。根据该技术原理开发的试剂盒也较多。

Materials

(1) 细胞破碎相关器械

(2) 低温离心机

(3) 各种离心管

(4) 旋涡混合器

(5) 细胞破碎相关试剂

(6) 水饱和酚(附录一)

(7) 80%乙醇

(8) RNase-free 级双蒸水

(9) 2 mol/L NaAc (pH4.0)(附录一)

(10) CIAA(氯仿/异戊醇)(附录一)

a. GTC 是强蛋白质变性剂。称重时注意防止在实验室扩散而影响其他有关蛋白质实验。称重后注意清洁天平。

(11) 变性液(4 mol/L GTC 溶液)

称取异硫氰酸胍(GTC，结晶) 236.3 g，溶于 280 mL 双蒸水中[a]

12.5 mL 1 mol/L 柠檬酸钠(pH7.0)

加 2.5 g 十二烷基肌氨酸钠，65℃温度下溶解

加水定容至 500 mL

使用时，每 50 mL 溶液中加 350 μL 巯基乙醇

(12) 异丙醇

ⓐ 按上节方法捣碎组织或破碎细胞，溶于 10 倍量的变性液中。用针头剪碎基因组 DNA。

↓

ⓑ 加 1/10 变性液体积的 2 mol/L NaAc(pH4.0)，充分混匀。

↓

ⓒ 加与变性液等体积的水饱和酚，用旋涡混合器搅拌 30 s。

↓

ⓓ 加 0.2 倍变性液体积的 CIAA，用旋涡混合器搅拌 30 s。

↓

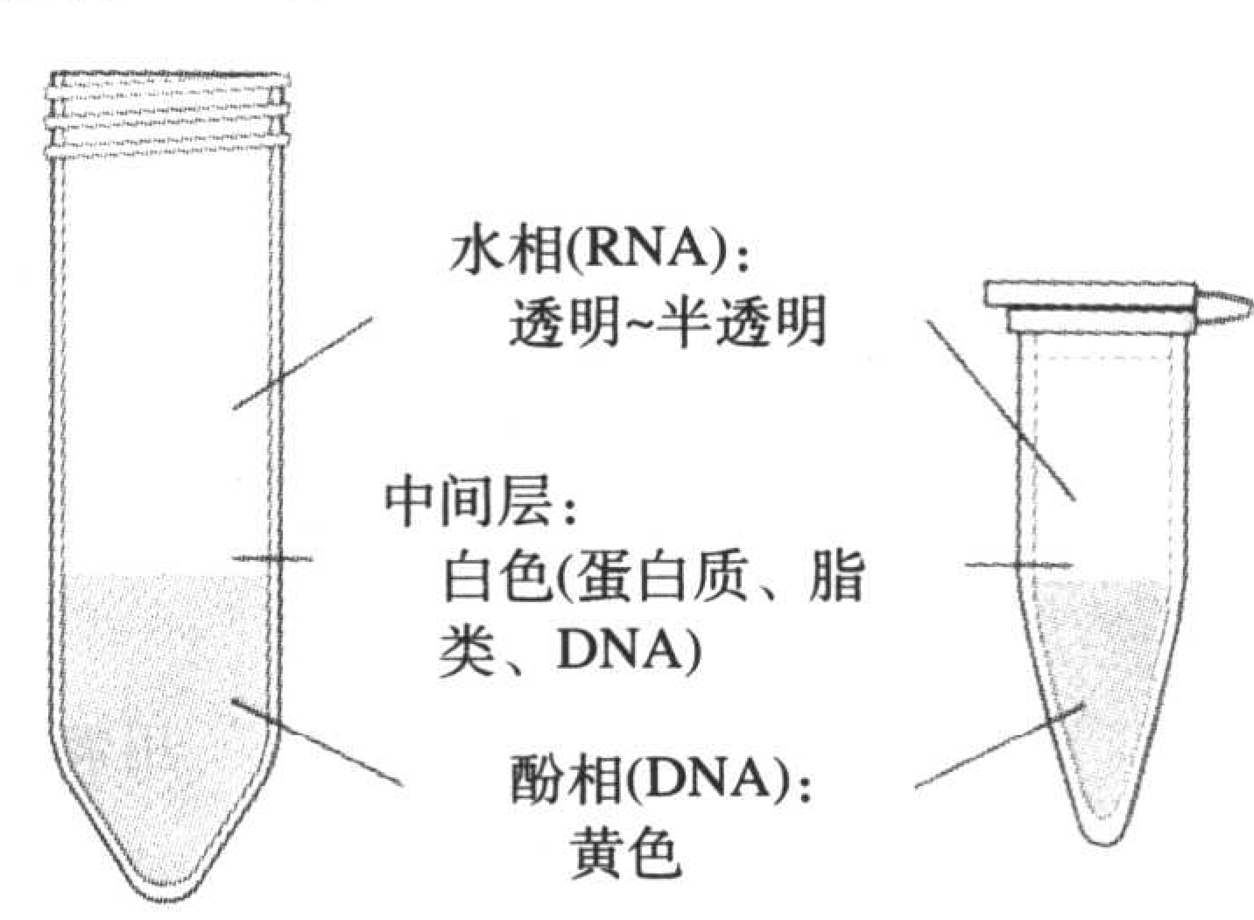
ⓔ 冰上静置 15 min，使分层。

↓

ⓕ 4℃、5000 *g* (1.5 mL 离心管为 15 000 r/min) 离心 20 min。

↓

ⓖ 离心后分 3 层：上层(水相，透明)，中间层(蛋白质、脂类、基因组 DNA)，下层(酚相)(见右图)。



酚抽提后的样品

↓

ⓗ 吸取水相至新离心管中，注意不要吸取中间层。

↓

ⓘ 加与变性液等体积的异丙醇，室温放置 10 min。

↓

ⓙ 4℃、5000 *g* (1.5 mL 离心管为 15 000 r/min)离心 10 min。

↓

ⓚ 弃上清。

↓

ⓛ 沉淀溶于 300~500 μL 变性液中(若用大离心管，此时可转至 1.5 mL 离心管)。

↓

ⓜ 加等体积异丙醇，−20℃静置 30 min。

↓

ⓝ 4℃、15 000 r/min 离心 10 min。

↓

ⓞ 弃上清，沉淀用 80%乙醇漂洗(此样品可长期保存)。

↓

ⓟ 4℃、15 000 r/min 离心 10 min。

↓

ⓠ 弃上清，倒置于干净吸水纸上，以去除净残留的乙醇(见右图)。

↓

ⓡ 开盖，风干[b]，注意防止灰尘进入。

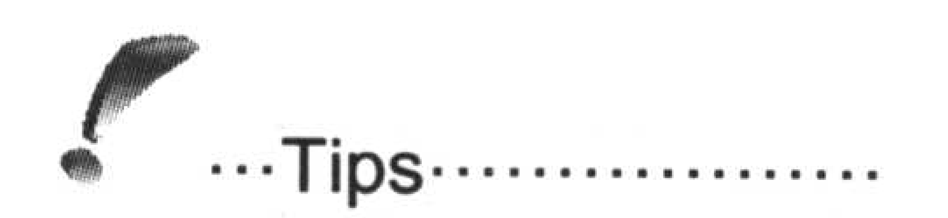
↓

ⓢ 溶于适量 RNA 专用水中[c]，取一部分测其浓度，其余可长期保存于−70℃冰箱中。

吸水纸
RNA
铝箔纸

b. RNA 过分干燥后很难溶解，因此应避免使用真空泵干燥。

c. 不同的细胞，回收的 RNA 量不同。用 $\Phi=9$ cm 培养皿的细胞，提取的 RNA 可溶于 10~20 μL 水中。



RNA 提取后，尽快用变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 是否已降解。若未被降解，则清晰可见 18 S 和 28 S 核糖体 RNA 带，且 28 S 带的亮度是 18 S 带亮度的 2 倍(图 19-4 泳道 2~6)，否则 28 S 比率减少(图 19-4 泳道 1)。

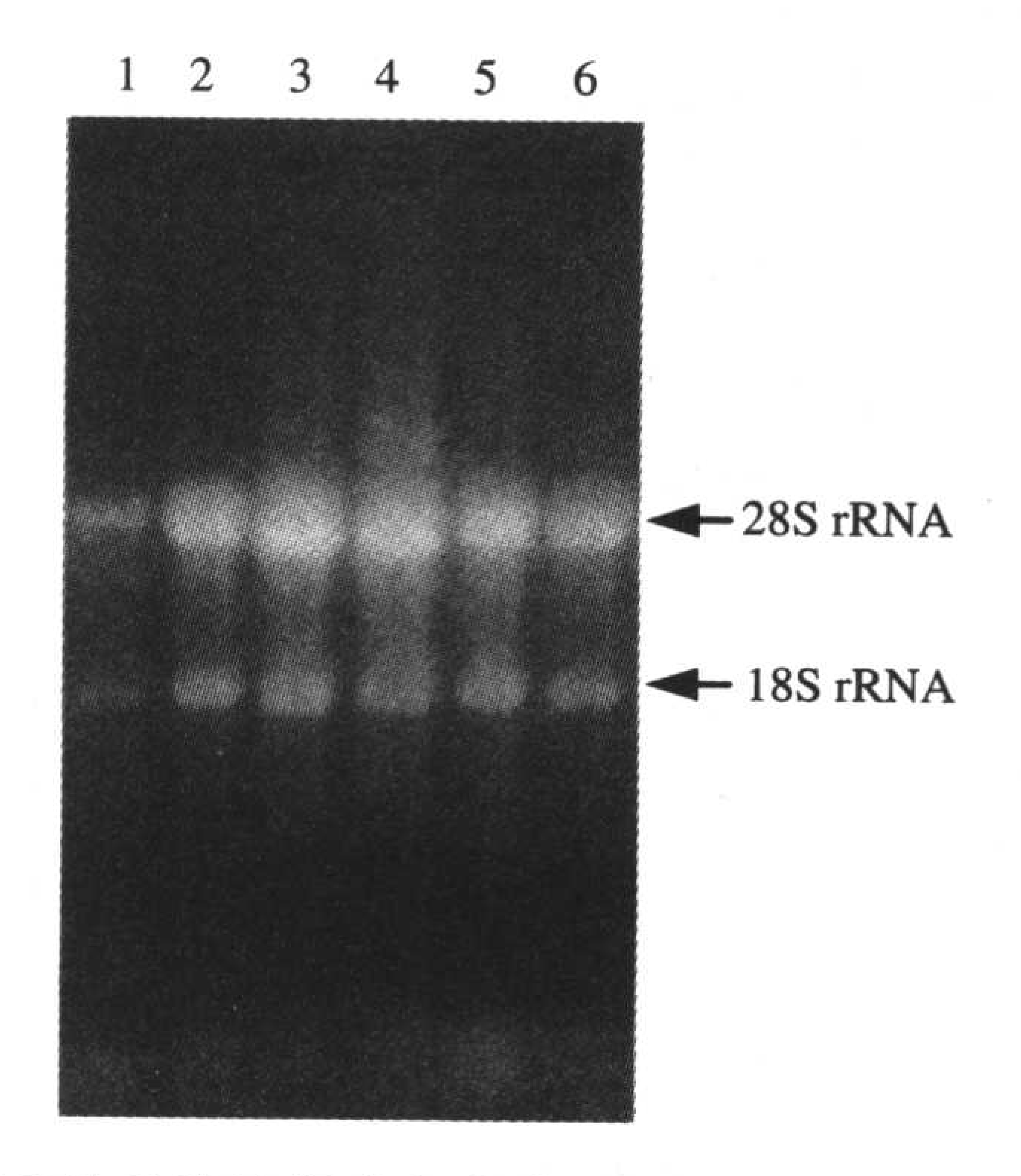


图 19-4　用变性琼脂糖凝胶电泳检测提取的小鼠总 RNA

泳道 2~6 的 28S rRNA 亮度是 18S rRNA 亮度的 2 倍，因此提取是成功的。泳道 1 的两条带亮度差不多，表示已降解

第四节　用 NP-40 法提取 RNA

细胞置于低渗透压下，从外界环境中吸水而膨胀，处于易裂解状态。利用表面活性剂乙基苯基聚乙二醇(Nonidet P-40，NP-40)提取细胞质 RNA 法是根据这一原理开发的(图 19-5)。该法的优点是：①核未破裂，RNA 不受细胞核内 RNase 所降解；②核未破裂，提取的 RNA 不被其基因组 DNA 所污染，可放心地应用于 RT-PCR 实验；③操作简单，节省时间，可同时进行多个样品的 RNA 提取。缺点是：①不能进行大量提取，特别是脏器等 RNA 的提取效率很低；②仅提取出细胞质 RNA，不能获得拼接前体 RNA，因此提取的 RNA 不能用于拼接体有关实验，应用领域相对狭窄。

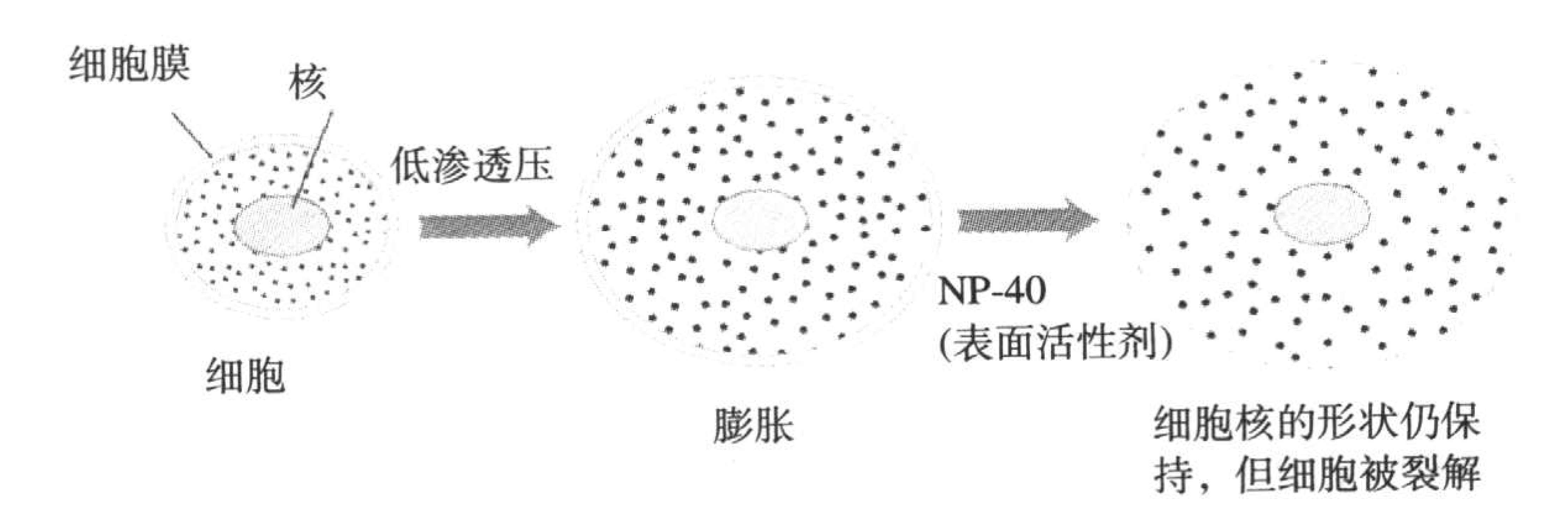


图 19-5　NP-40 法的原理

Materials

a. VRC(vanadyl ribonuclecside complex，氧钒核糖核苷复合物)是一种 RNase 抑制剂。
b. 原液为 200 mmol/L 的析出液，大部分为沉淀。混匀后分装至小管。

(1) 细胞破碎相关器械
(2) 细胞破碎相关试剂
(3) 低温离心机
(4) 200 mmol/L VRC(GIBCO-BRL 公司，15522-104)[a] 充分溶解后分装成 0.5~1.0 mL/管[b]，保存于−20℃
(5) 10% NP-40
　将 5 mL NP-40 加入到 40 mL RNA 专用水中，搅拌直至完全溶解。混匀后定量至 50 mL，室温遮光保存
(6) 裂解缓冲液

1 mol/L Tris・HCl (pH8.0) (附录一)	1 mL
5 mol/L NaCl	0.2 mL
1 mol/L $MgCl_2$(附录一)	0.3 mL
RNA 用双蒸水	98.5 mL
总体积	100 mL

高温高压灭菌后，保存于室温，用前每毫升加 50 μL VRC，放置冰上

(7) 旋涡混合器
(8) 各种离心管
(9) 蛋白酶 K (附录一)
(10) 2×蛋白酶 K 缓冲液(附录一)
(11) RNA 用苯酚(附录一)
(12) RNA 用酚/氯仿(附录一)
(13) 100%乙醇
(14) 80%乙醇
(15) RNase-free 双蒸水
(16) 异丙醇
(17) 3 mol/L NaAc(pH7.0 或 pH5.2)(附录一)

Protocols　　　　Time：2 h

材料量：1×10^7 以下的悬浮细胞，$\Phi = 9$ cm 培养皿的黏附细胞，50 μL 以下的组织

ⓐ 按上节介绍的方法收集细胞或组织：黏附细胞离心后收集沉淀于 1.5 mL 离心管内。悬浮细胞离心后悬浮于 1 mL 预冷的 1×PBS 中，再转移至 1.5 mL 离心管内，离心后弃上清。组织研磨成粉末后转移至 1.5 mL 离心管。

↓

ⓑ 细胞(或组织粉末)中加 400 μL 裂解缓冲液(加 VRC，浑浊状)，用微量移液器缓慢吸打，注意不要产生气泡。

↓

ⓒ 冰上静置 5 min。

↓

ⓓ 加 20 μL 10% NP-40，用旋涡混合器搅拌 30 s。

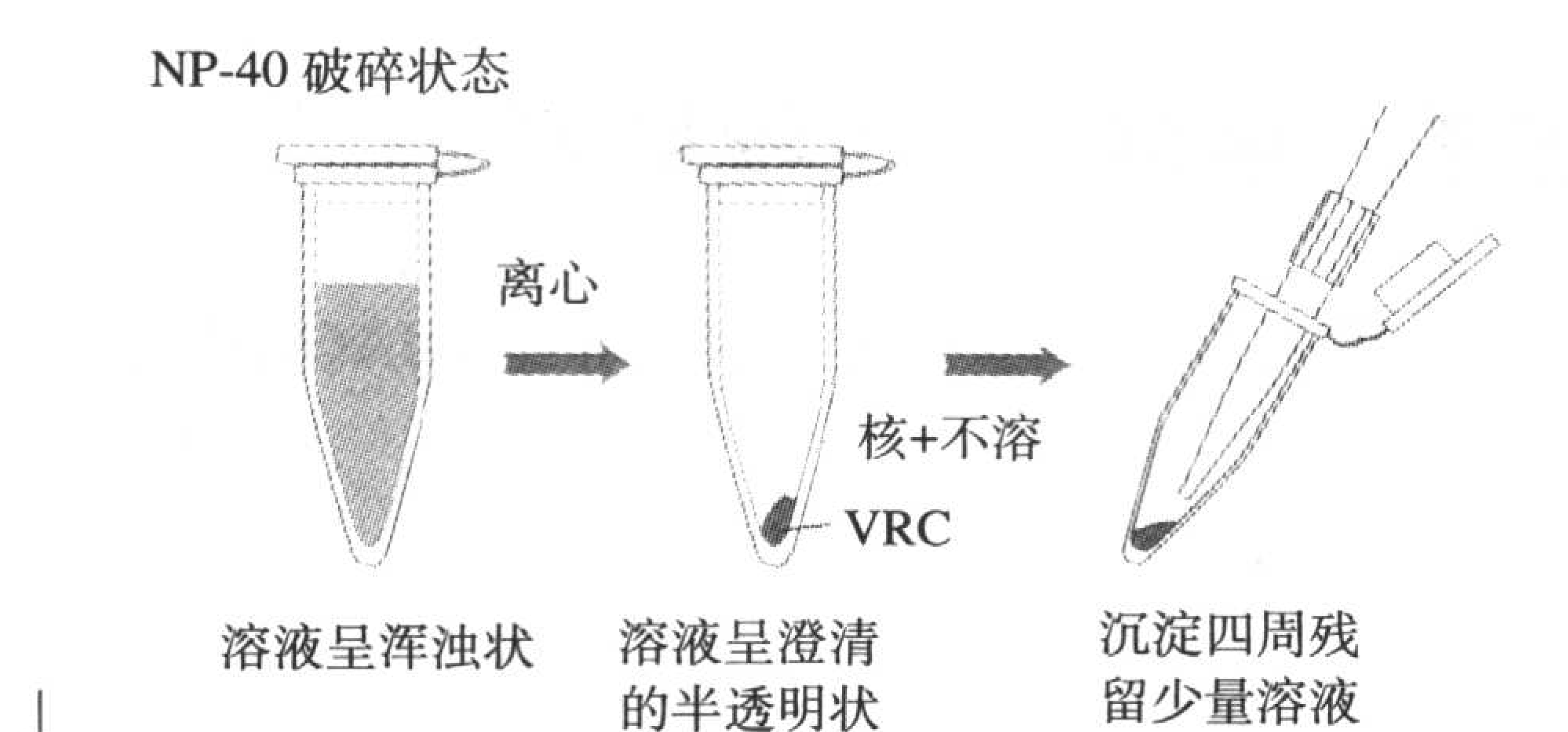
↓

ⓔ 4℃、15 000 r/min 离心 5 min，加 2×蛋白酶 K 缓冲液后分装成每管 375 μL。

↓

ⓕ 离心，沉淀为不溶的 VRC 和细胞核[c]，上清分装成每管 375 μL，再分别加 375 μL 2×蛋白酶 K 缓冲液。

c. 对该沉淀进行酚抽提，可抽提出基因组 DNA。但 VRC 阻碍酶切反应，因此必须反复酚抽提去除。



↓

ⓖ 充分混匀后，37℃保温 40 min[d]。

↓

ⓗ 加 700 μL 酚后，用旋涡混合器充分搅拌均匀(3 min)以除去蛋白质和 VRC[e,f]。

d. 可适当延长些保温时间。

e. VRC 混入不影响 RNA，但影响 260 nm 光吸收而影响 RNA 定量。

f. 在搅拌中，酚层颜色由黄色变黑，此时应继续搅拌。

↓

ⓘ 室温、15 000 r/min 离心 3 min。

↓

ⓙ 上清转移至新管，注意不要吸取酚层和中间层。

↓

ⓚ 加 700 μL 酚/氯仿/异戊醇，用旋涡混合器充分搅拌 3 min。

↓

ⓛ 室温、15 000 r/min 离心 3 min。

↓

ⓜ 按ⓚ、ⓛ步骤再进行一次酚/氯仿/异戊醇抽提[g]。

g. 若仍残留 VRC(呈浑浊状)，则应再反复进行酚/氯仿/异戊醇抽提。若最后异丙醇沉淀物为黑色，则表示沉淀中残留 VRC。

↓

ⓝ 酚/氯仿/异戊醇抽提完毕后，上清转移至新管。加 70 μL 3 mol/L NaAc 和 700 μL 异丙醇，−70℃静置 5 min(此步可长期保存 RNA 样品)。

↓

ⓞ 4℃、15 000 r/min 离心 10 min。

↓

ⓟ 弃上清，沉淀用 50 μL 80%乙醇漂洗。

↓

ⓠ 4℃、15 000 r/min 离心 5 min。

↓

ⓡ 弃上清。

↓

ⓢ 干燥沉淀(RNA)。

↓

ⓣ 用 20 μL RNA 专用水溶解沉淀，取少量测 RNA 浓度。

↓

ⓤ 电泳检测 RNA 质量。

第五节　使用试剂盒提取 RNA

市场上有各种试剂盒销售，其原理也不尽相同。这里介绍 QIAGEN 公司 RNeasy 试剂盒的使用方法(图 19-6)。

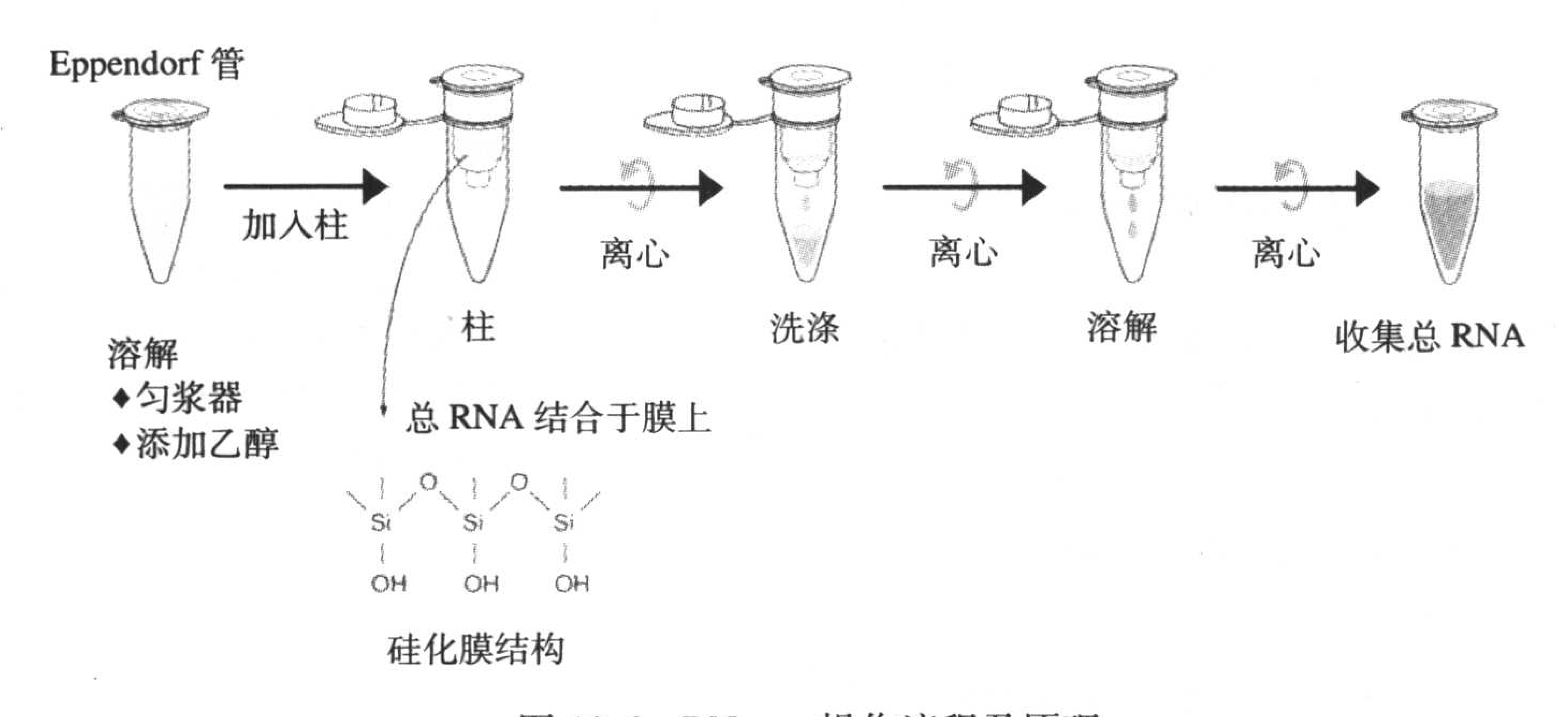


图 19-6　RNeasy 操作流程及原理

Materials

(1) 离心机(室温)

(2) 匀浆机

(3) 一次性手套

(4) 锤子(组织材料时)

(5) 研钵(组织材料时)

(6) 注射器及 20~21 号针头(培养细胞时)

(7) RNeasy 试剂盒(QIAGEN 公司)：根据样品量选择柱种类(表 19-1)

(8) 14.5 mol/L β-巯基乙醇(BME)

(9) 100%乙醇、70%乙醇

(10) 液氮(组织材料时需要)

(11) RNase-free 级微量移液器及枪尖

表 19-1　RNeasy 试剂盒种类及产量

	RNeasy 微型柱		RNeasy 中型柱		RNeasy 巨型柱	
	组织/mg 或细胞数	平均产量/μg	组织/mg 或细胞数	平均产量/μg	组织/g 或细胞数	平均产量/mg
动物细胞						
HeLa	1×10^6	15	7×10^7	1000	4×10^8	6
COS-7	1×10^6	35	3×10^7	950	1.8×10^8	5.8
组织						
脑	10	8	100	100	0.5	0.6
肝脏	10	40	200	700	1.0	3.6
E. coli	1×10^9	55	1×10^{10}	600	5×10^{10}	2.7
酵母	1×10^7	25	2×10^8	450	1×10^9	2.4

表 19-2 列举了不同柱对应的样品量

表 19-2 适于 RNeasy 试剂盒的样品量

样品	RNeasy 微型柱	RNeasy 中型柱	RNeasy 巨型柱
动物细胞	$10\sim1\times10^7$(细胞数)	$5\times10^6\sim1\times10^8$	$5\times10^7\sim5\times10^8$
组织	0.5~30 mg	20~250 mg	150 mg~1g
E.coli	$\leqslant1\times10^9$	$5\times10^8\sim1\times10^{10}$	$5\times10^9\sim5\times10^{10}$
酵母	$\leqslant5\times10^7$	$2\times10^7\sim5\times10^8$	$2.5\times10^8\sim2.5\times10^9$

(1) 裂解细胞，用 RLT 缓冲液制备匀浆物

(约需 15~30 min，不同组织或细胞流程不同)[a]

A. 组织材料

ⓐ 组织取出后立即保存于液氮中。

↓

ⓑ 实验时用锤子捣碎组织，按表 19-2 量称取样品，投入装有液氮的研钵中。

↓

ⓒ 研磨成粉末状。

↓

ⓓ 粉末转入加有 RLT 缓冲液的匀浆器中，匀浆。

↓

ⓔ 匀浆物离心(室温、3000~5000 *g*、5 min)，上清转移至新管。

B. 培养细胞

ⓐ 按表 19-2 收集合适量的细胞。

↓

ⓑ 离心后，沉淀中加 RLT 缓冲液。

↓

ⓒ 用 20~21 号的针头剪碎基因组 DNA 成匀浆物。

(2) 匀浆物过柱，提取总 RNA(30 min~1 h)

ⓐ 在匀浆物中，加入与 RLT 缓冲液等量的 70%乙醇。若出现白色沉淀，则用旋涡混合器充分混匀[b]。

↓

ⓑ 将样品转至 RNeasy 旋转柱中，室温、5000 *g* 离心[c]。

↓

ⓒ 弃样品收集管中的滤液(废液)。

↓

a. RLT 缓冲液中加 1% (*V/V*)14.5 mol/L 巯基乙醇。

b. 混合不彻底，将混杂有 DNA。

c. 离心时间随柱的大小而异。请参考说明书。

ⓓ 在柱中加 RW1 缓冲液。室温、5000 *g* 离心，弃滤液。

↓

ⓔ 在柱中加 RPE 缓冲液[d]。室温、5000 *g* 离心。

d. 事先在RPE缓冲液中加4倍体积的乙醇。

↓

ⓕ 弃样品收集管中的滤液(废液)，加 RPE 缓冲液，用最大速度离心。

↓

ⓖ 柱转移至新的 Eppendorf 管。加 RNase-free 双蒸水，静置 1 min。室温离心(5000~8000 *g*)。若想提高 RNA 量，再加 RNase-free 水离心一次。

↓

ⓗ 取少量测 RNA 浓度。−70℃保存 RNA 样品。



使用试剂盒提取 RNA 的关键是温度，制成匀浆物后所有操作都是在室温下进行的。若某一步在低温下操作，则 RNA 提取不出来。

…Questions………………

1. 本章中提到了哪几种 RNA 提取方法，其主要原理是什么？各需注意哪些事项？此外还有哪些 RNA 提取方法？
2. RNA 提取过程中如何防止细胞内外 RNase 污染？如何防止 DNase 中的 RNase 污染？
3. 对于动植物而言，什么材料最适合提取 RNA？为什么有时要以不同器官或组织为材料分别提取 RNA？
4. RNA 提取过程中如何防止基因组 DNA 的污染？
5. 如何延长 RNA 的保存时间？在保存过程中应注意哪些问题？
6. RNA 变性电泳的原理是什么？如何通过电泳图谱判定 RNA 质量？

第二十章　纯化 poly(A)⁺RNA

第十九章中提取的 RNA 是总 RNA，80%~85%是核糖体 RNA(rRNA)，10%~ 20%是转移 RNA(tRNA)，只有 2%~5%是基因克隆中非常重要的信使 RNA (mRNA)。若想构建出高质量的 cDNA 文库，必须从总 RNA 中纯化出 mRNA。此外，Northern 杂交、RT-PCR 等实验也需要纯化的 mRNA。

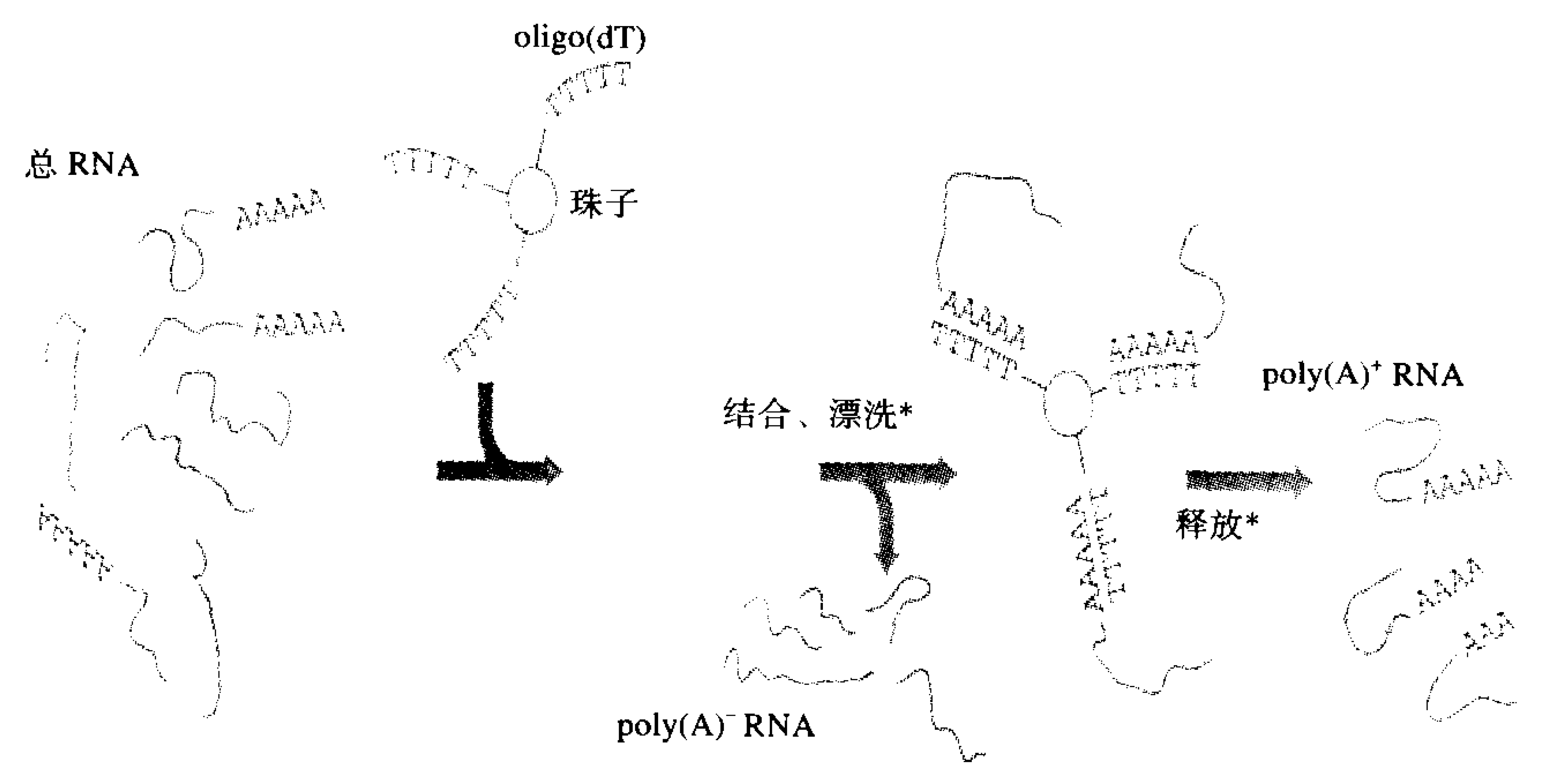


图 20-1　纯化 poly(A)⁺ RNA 原理

* 表示 poly(A)⁺在高盐下与 oligo(dT)结合，在低盐下解离

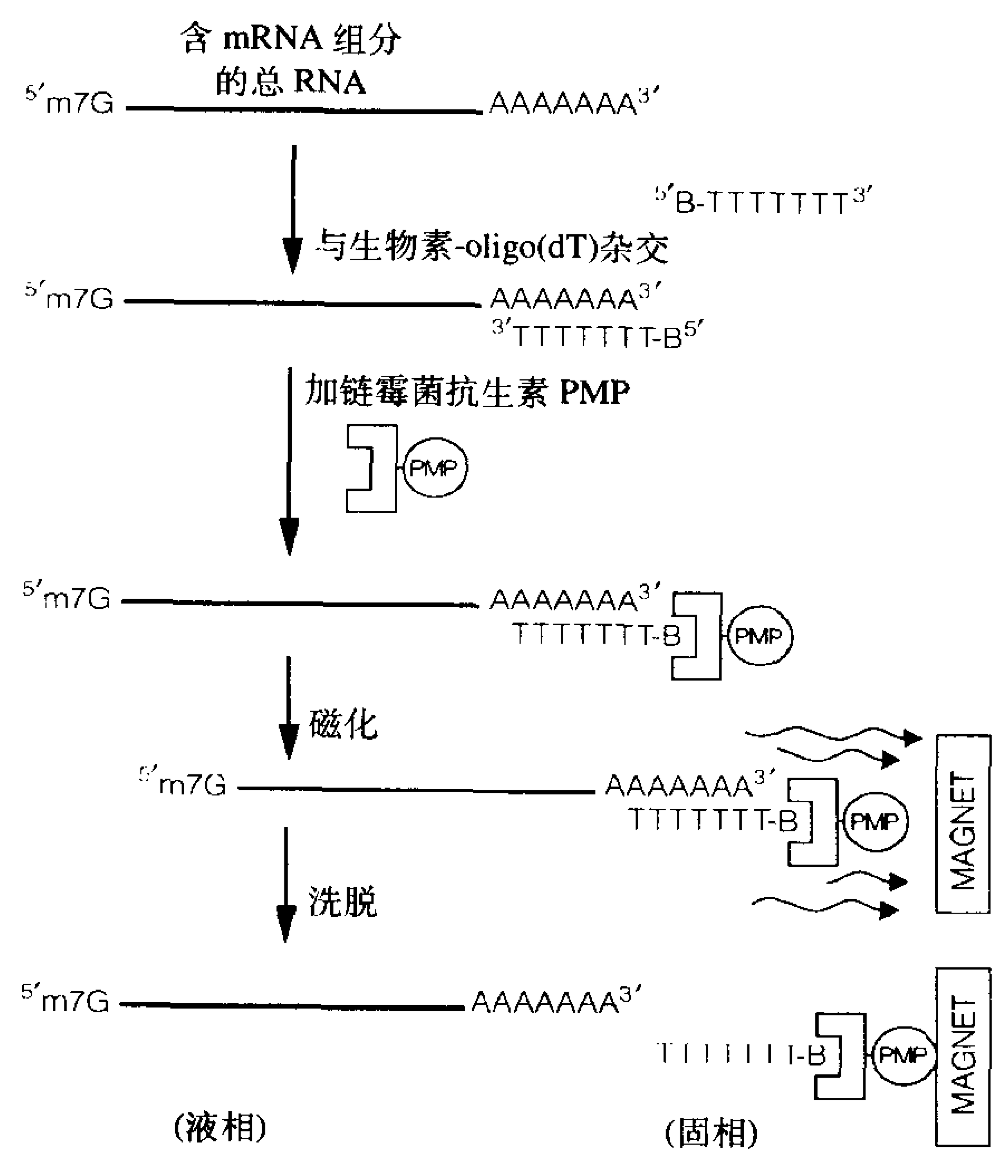


图 20-2　Promega 公司开发的从总 RNA 中富集 poly(A)⁺ mRNA 的原理图

真核生物 mRNA 在被转录时，3′ 端总是添加一些聚腺苷酸，这些聚腺苷酸叫做 poly(A)尾。具有 poly(A)尾的 RNA 叫做 poly(A)$^+$ RNA。rRNA 与 tRNA 不具有 poly(A)尾。因此以 poly(A)尾为基础进行的纯化就能分离出 mRNA。poly(A)与 poly(U)或 poly(dT)能退火配对，因此，常用 oligo(dT)珠子选择吸附 poly(A)$^+$ RNA，达到纯化 poly(A)$^+$ mRNA 的目的(图 20-1)。图 20-2 是 Promega 公司利用磁性 oligo(dT)珠子富集 poly(A)$^+$ mRNA 的原理图。也有不带 poly(A)尾的 mRNA，若想利用它进行实验，则应使用总 RNA。

第一节　利用 oligo(dT)纯化 poly(A)$^+$ mRNA

oligo(dT)-tex 珠虽然比较贵，但纯化效率极高，且操作极其简单，能回收多个样品的 poly(A)$^+$ mRNA。

Materials

(1) 恒温箱(37℃、65℃)
(2) 低温离心机
(3) Eppendorf 管
(4) 旋涡混合器
(5) oligotex-dT30(super)(TaKaRa 公司)
(6) 漂洗缓冲液

1 mol/L Tris・HCl (pH7.5)(附录一)	500 μL
5 mol/L Na_2EDTA(pH8.0)	100 μL
10% SDS(附录一)	500 μL
5 mol/L NaCl	5 mL
RNA 用双蒸水	43.9 mL
总体积	50 mL，室温保存

(7) 5 mol/L NaCl
(8) RNA 用酚/氯仿
(9) 2×解离缓冲液

1 mol/L Tris・HCl(pH7.5)(附录一)	1 mL
0.5 mol/L Na_2EDTA(pH8.0)	200 μL
10% SDS(附录一)	1 mL
RNA 用双蒸水	47.8 mL
总体积	50 mL

(10) 3 mol/L NaAc (pH7.0 或 5.2)(附录一)
(11) 100%乙醇
(12) 80%乙醇
(13) RNase-free 双蒸水
(14) 叠氮化钠

Protocols　　　　Time：2~3 h

(1) oligotex 与 poly(A)$^+$mRNA 退火

ⓐ 准备 RNA 专用离心机、恒温箱(37℃或 65℃)、冰等。

↓

ⓑ 取 150 μg 总 RNA，定量至 50 μL。

↓

ⓒ 加 50 μL 2×溶解缓冲液，充分振荡。

↓

ⓓ 吸打使 oligotex 储液混匀，取 100 μL 加至 RNA 溶液中。

↓

ⓔ 65℃保温 5 min 后转至冰上骤冷 3 min [a]。

a. 此操作目的是破坏RNA的二级结构。

↓

ⓕ 加 20 μL(1/20 体积) 5 mol/L NaCl，充分混匀。

↓

ⓖ 37℃保温 10 min，使 oligotex 与 poly(A)$^{+}$mRNA 配对。

(2) 漂洗

ⓐ 室温、15 000 r/min 离心 3 min。

↓

ⓑ 小心吸取上清转移至另一 Eppendorf 管。上清为 poly(A)$^{-}$ RNA，保存于–70℃或弃之。

↓

ⓒ 用 10 μL 漂洗缓冲液漂洗沉淀(oligotex)，并使之悬浮起来。

↓

ⓓ 室温、15 000 r/min 离心 3 min，弃上清[b]。

b. 再用含 0.1 mol/L NaCl 解离缓冲液漂洗一次，其纯度更高。

(3) 解离

ⓐ 在沉淀中加入 100 μL RNA 专用双蒸水及 100 μL 2×解离缓冲液，吸打混匀成悬浮状。

↓

ⓑ 65℃保温 5 min 后，室温、15 000 r/min 离心 3 min。

↓

ⓒ 小心吸取上清，转移至新管。

↓

ⓓ 加 200 μL 等体积酚/氯仿/异戊醇，混匀后，室温、15 000 r/min 离心 3 min。

↓

ⓔ 上清转移至新管，加 20 μL(1/20 体积)NaAc 和 500 μL 乙醇，–70℃下静置 30 min。

↓

ⓕ 4℃、15 000 r/min 离心 10 min，弃上清。沉淀用 100 μL 预冷 80%乙醇漂洗，4℃、15 000 r/min 离心 5 min 后彻底弃上清。

↓

ⓖ 风干沉淀，溶于 50 μL RNA 专用双蒸水中。

↓

ⓗ 取 1 μL 测光吸收值，确定其浓度。

(4) oligotex 回收

ⓐ 在 100 μL 初始 oligotex 中加 100 μL(等量) 0.1 mol/L NaOH。

↓

ⓑ 室温下静置 30 min 以上，降解残留 RNA[c]。

c. 可适当延长时间，但最好在当天处理完毕。

↓

ⓒ 室温、15 000 r/min 离心 3 min 后弃上清。

↓

ⓓ 加 200 μL RNA 用双蒸水，混匀后，室温、15 000 r/min 离心 3 min，弃上清。

↓

ⓔ 再重复步骤ⓓ2 次。

↓

ⓕ 悬浮于 100 μL 1×解离缓冲液中，加叠氮化钠至终浓度 0.1%。

↓

ⓖ 4℃保存。回收的 oligotex 分别按使用 2 次，使用 3 次等分开保存[d]。

d. 一般可重复使用 3~4 次。

第二节 用 oligo(dT)·纤维素进行柱层析

前述 oligo(dT)-tex 珠法虽简单，但处理大量样品时因需要量较多，经济成本较高。若样品数较少，而样品量大(数十微克)时，用传统的 oligo(dT)·纤维素柱层析方法较为经济。

Materials

(1) 0.7×4 cm 微型柱(Bio-Rad 公司)

(2) 活塞

(3) 恒温箱(65℃)

(4) 低温离心机

(5) 1.5 mL Eppendorf 管

(6) oligo(dT)·纤维素(dT 长度为 12~18 nt)

(7) 0.2 mol/L NaOH

制备 2 mol/L NaOH(4 g NaOH 溶解于 RNA 专用水，并定容至 50 mL)后，用 RNA 专用双蒸水稀释 10 倍

(8) 结合缓冲液

1 mol/L Tris·HCl (pH7.5)(附录一)	2 mL
5 mol/L NaCl	20 mL
RNA 用双蒸水	178 mL
总体积	200 mL

高温、高压灭菌后室温保存

(9) 5 mol/L NaCl

(10) 3 mol/L NaAc(pH7.0 或 pH5.2)(附录一)

(11) 100%乙醇

(12) 80%乙醇

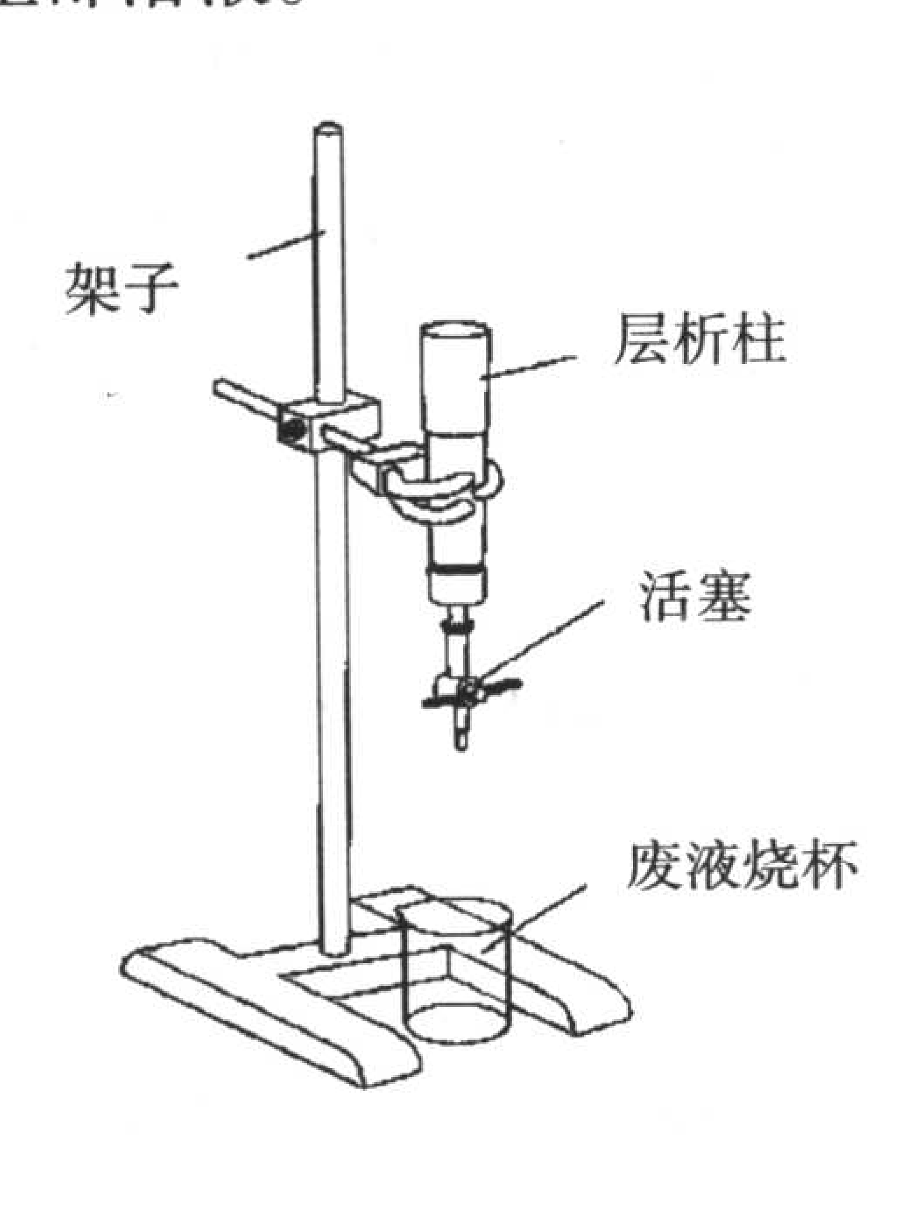
Protocols　　Time：4~5 h

(1) 准备层析柱

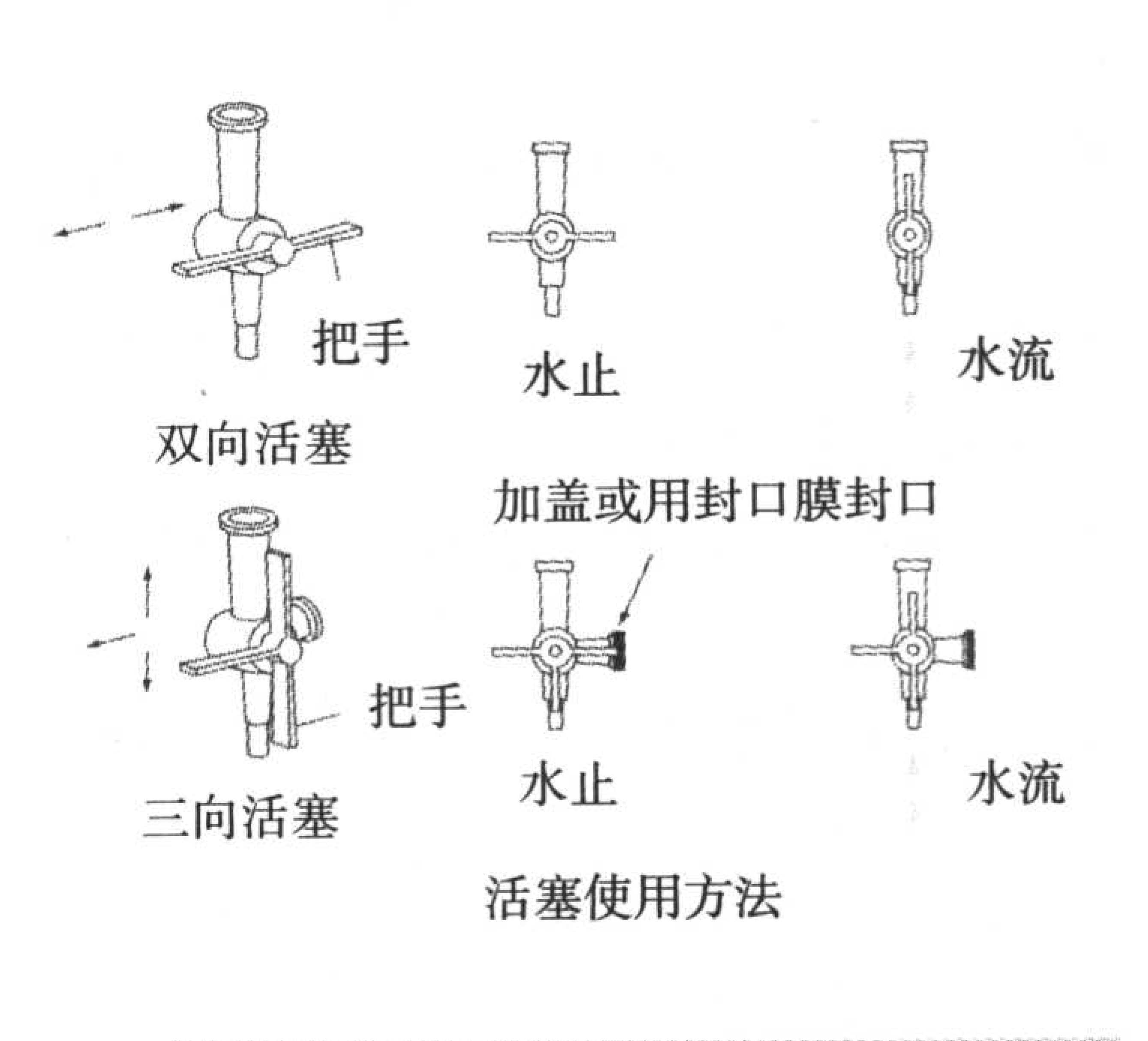
ⓐ 将层析柱架于架子上，关上活塞(右图)。

↓

ⓑ 层析柱中注满 0.2 mol/L NaOH，静置 20 min 后[a]，打开活塞流掉全部溶液。



↓



活塞使用方法

a. 除了降解 RNase 外，还可降解回收柱中残留的 RNA。

ⓒ 灌注 RNA 专用水漂洗层析柱活塞。通常漂洗水的量是 NaOH 量的 10 倍。

(2) oligo(dT)・纤维素的准备

ⓐ 称取 0.3 g oligo(dT)・纤维素于瓶中，加少量结合缓冲液振荡使之悬浮。

↓

ⓑ 关闭干净的层析柱活塞，自上而下灌注悬浮的 oligo(dT)・纤维素，灌满后稍微打开活塞使液体流出至液面与 oligo(dT)面平齐后，关闭活塞，再加 oligo(dT)・纤维素悬浮液。

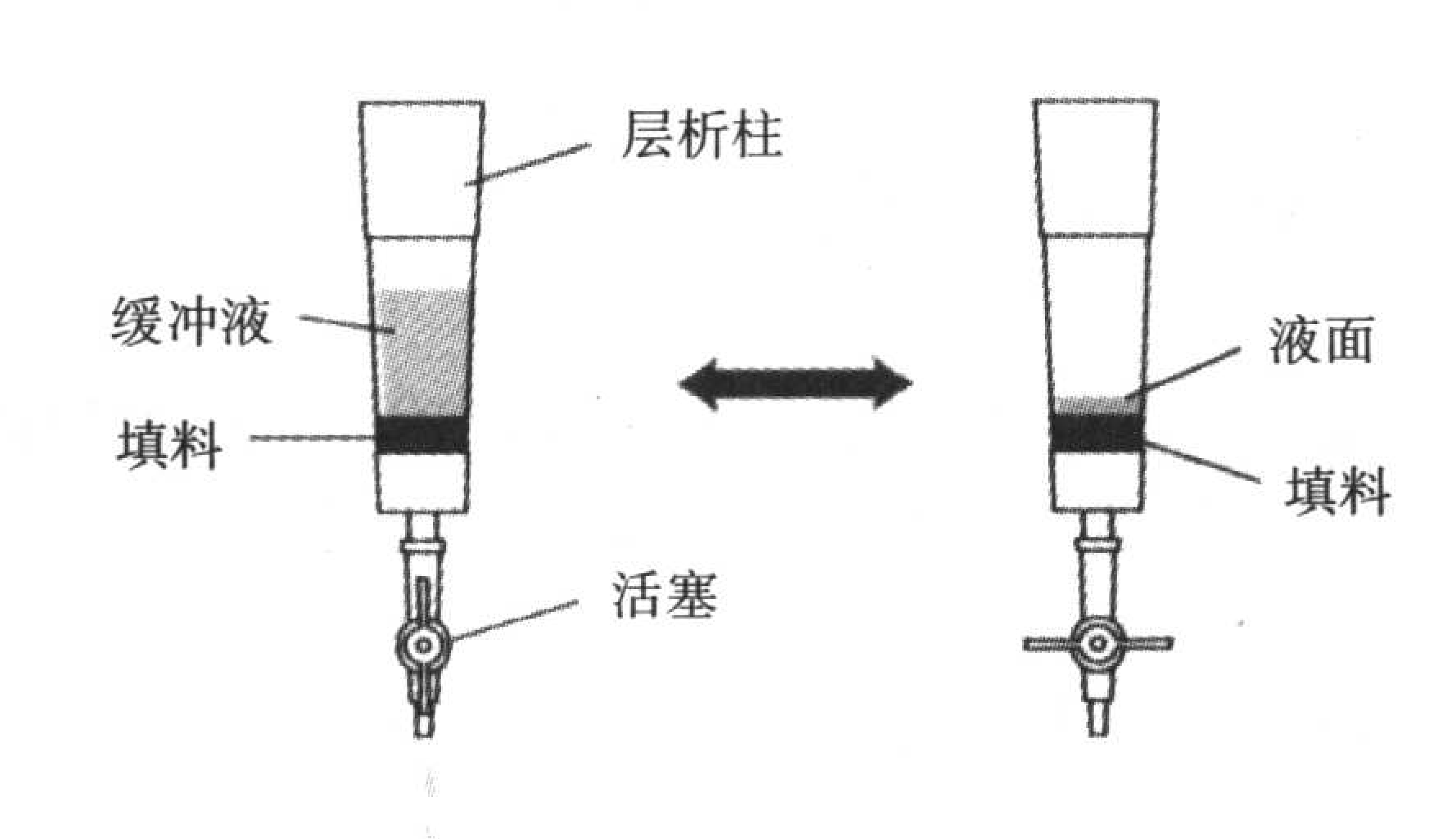
↓

ⓒ 全部 oligo(dT)・纤维素上样完后，待其全部沉入层析柱底部。

↓

ⓓ 打开活塞，流出液体使液面到达填料位置，关闭活塞[b]。

b. 绝不允许填料干燥。



↓

打开活塞流出液体　　液面流至填料位置，关闭活塞

ⓔ 自上小心注入结合缓冲液，打开活塞流出液体，总计用 10 倍层析柱体积的缓冲液漂洗层析柱和填料。

↓

ⓕ 待液面降至填料位置关闭活塞，用封口膜封住层析柱口。

(3) poly(A)$^+$ RNA 纯化

ⓐ 用 1350 μL RNA 专用水溶解 2~3 mg 总 RNA 于 1.5 mL Eppendorf 管内。

↓

ⓑ 65℃保温 5 min 后冰上骤冷 3 min[c]。

c. 破坏 RNA 的二级结构。

↓

ⓒ 加 150 μL 5 mol/L NaCl，充分搅拌。

↓

ⓓ 小心将 RNA 溶液上样至层析柱内(注意不要破坏填料表面)(见ⓕ图)

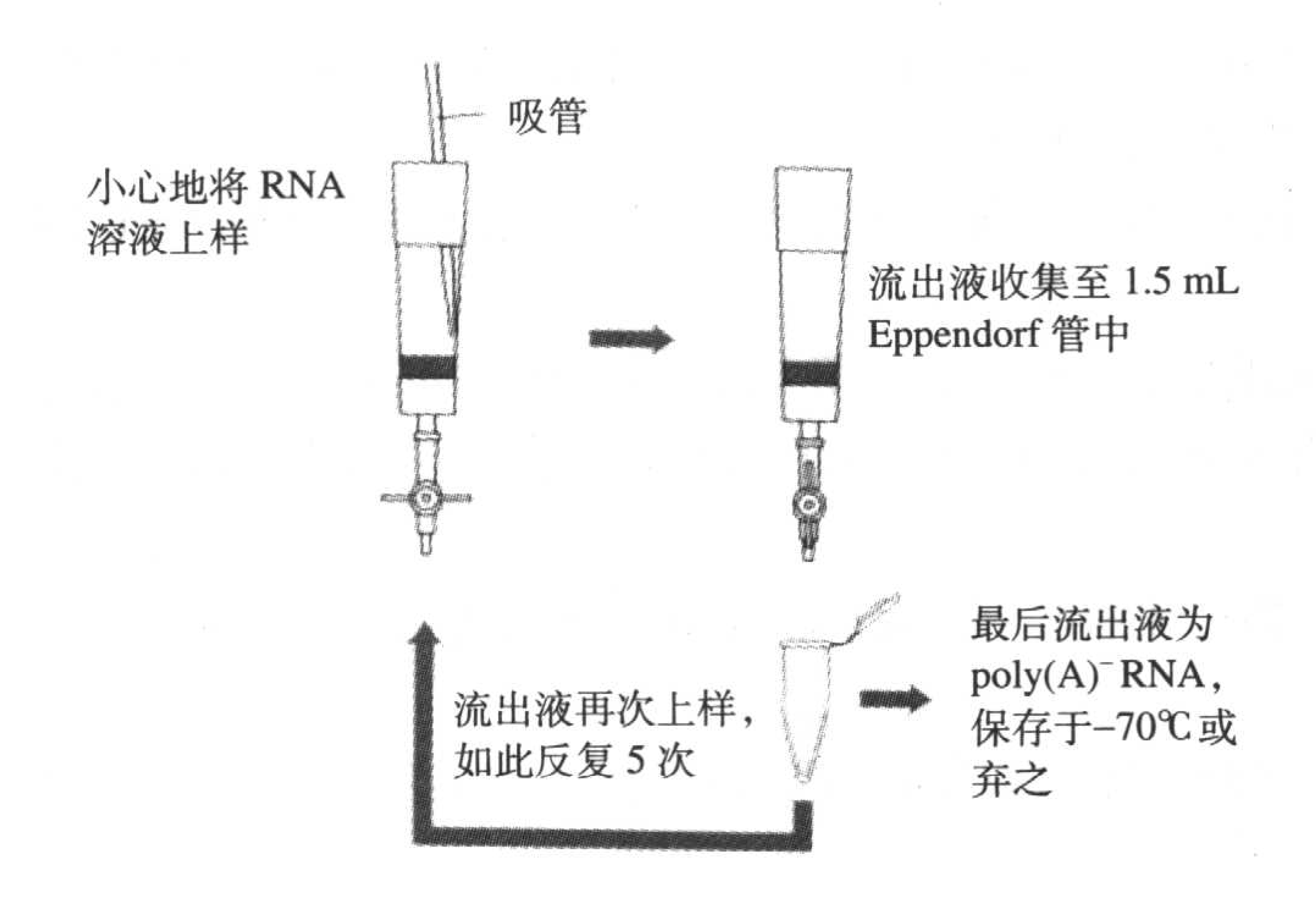
↓

ⓔ 打开活塞，液体流至 1.5 mL Eppendorf 管内，直至液面至填料表面[d]。

d. 注意防止填料干燥。

↓

ⓕ 收集的液体再上样至层析柱内。再按ⓔ步操作收集。如此反复 5 次。



↓

ⓖ 最后洗出液为 poly(A)⁻ RNA，保存或弃之。

↓

ⓗ 自层析柱顶端小心灌注 7 倍柱体积的结合缓冲液，打开活塞使液体流出，以涮洗填料。在操作中应特别注意不要使填料干燥，别破坏填料表面形状。

↓

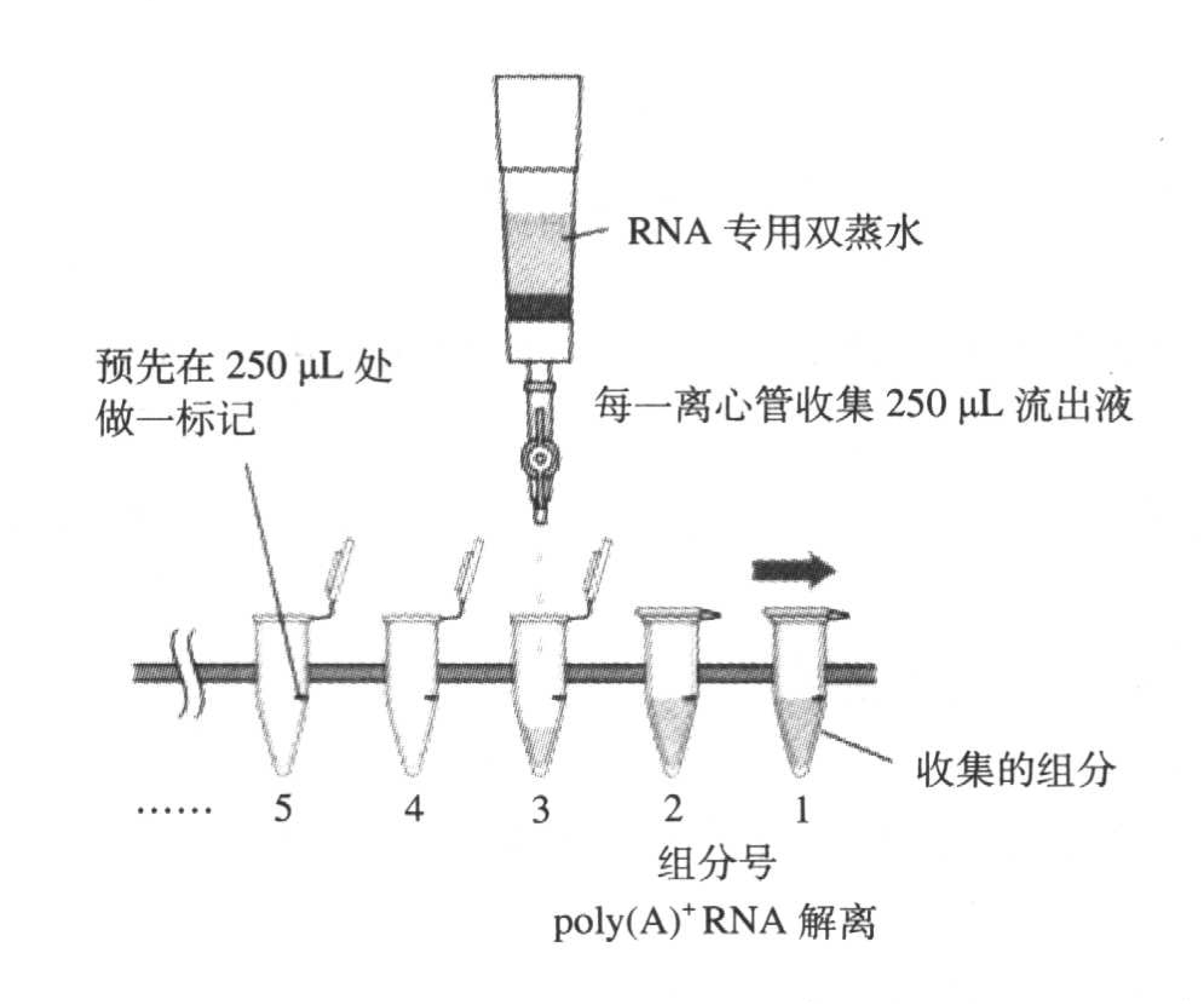
ⓘ 准备收集用的 Eppendorf 管 10 支，在 250 μL 位置处做一标记。

↓

ⓙ 待结合缓冲液面刚好与填料表面平齐时关闭活塞，小心灌入 RNA 专用双蒸水。

↓

ⓚ 打开活塞，每 250 μL 一管收集各组分，收集的组分置于冰上。



poly(A)⁺RNA 解离

↓

ⓛ 取各组分溶液少许，测 260 nm 光吸收，合并吸收峰高的组分 2~3 管。

↓

ⓜ 加 1/10 体积 3 mol/L NaAc 和 2.5 倍体积乙醇，−70℃静置 30 min。

↓

ⓝ 4℃、15 000 r/min 离心 10 min，弃上清。沉淀用 100 μL 80%乙醇漂洗后，4℃、15 000 r/min 离心 5 min，弃上清。

↓

ⓞ 沉淀风干后，溶于 10~100 μL RNA 专用水中。若有多管组分，则合并成一管。

↓

ⓟ 取少量测 A_{260} 值以确定浓度，其余保存于−70℃。

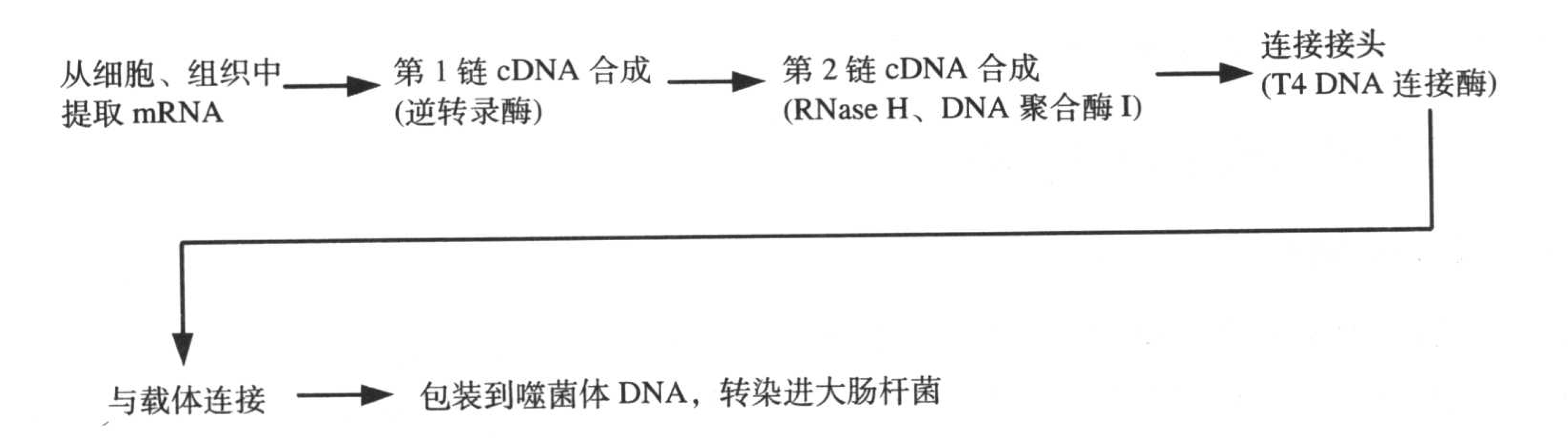
↓

ⓠ 用甲醛变性凝胶电泳检测 RNA 质量。

…Questions………………

1. 总 RNA 中主要包括哪几种 RNA？基因操作中常需要哪类 RNA？
2. 简述纯化 poly(A)$^+$ RNA 的基本原理。若某 mRNA 不带 poly(A)尾，如何利用它进行 RT-PCR 实验？
3. 为何要纯化 poly(A)$^+$ RNA？操作过程中需要注意哪些问题？
4. 纯化所得 poly(A)$^+$ RNA 的产量一般在什么范围内？如何提高产量？
5. 纯化动物与植物 poly(A)$^+$ RNA 的流程有区别吗？为什么？
6. 分别用总 RNA 和 poly(A)$^+$ RNA 构建的 cDNA 文库有区别吗？为什么？

第二十一章　构建 cDNA 文库



为了研究基因的结构与功能，必须首先利用 DNA 重组技术将该基因分离出来，这个过程叫克隆。为完成基因克隆，一般需要构建含目的基因的基因文库。将染色体基因组 DNA 或 mRNA 逆转录所得 cDNA 重组进噬菌体或质粒等载体，获得的重组体的总称为基因文库。如与载体连接的是 cDNA，则叫 cDNA 文库；如与载体连接的是 DNA，则叫基因组文库。基因组文库的构建见第十章，本章介绍 cDNA 文库构建方法。

第一节　以质粒为载体构建 cDNA 文库

为构建优质 cDNA 文库，必须准备好高质量 mRNA。mRNA 非常不稳定，操作上应特别注意。降解 mRNA 的 RNase 非常稳定、且广泛存在，因此在整个操作过程中应尽量避免 RNase 污染，并设法抑制其活性。首先应尽量使用 RNase-free 级的塑料制品，若必须使用玻璃器皿，应预先将其在 180℃下干热灭菌 4 h 以上。试剂及微量移液器等最好专用。实验中严禁闲谈。

使用试剂盒来构建 cDNA 文库，有如下优点：①便宜；②附有详细的操作流程；③实验结果稳定。有许多试剂公司生产构建 cDNA 文库的试剂盒，这里以 LifeTech 公司的 SuperScript Plasmid System 试剂盒为例介绍试剂盒的使用方法。图 21-1 是以质粒为载体[a]构建 cDNA 文库的基本步骤。

a. 使用质粒为载体，操作简单，易完成目的基因的筛选。

(1) 使用逆转录酶合成第 1 链(mRNA 互补的单链 DNA)；

(2) 使用 RNase H 与 DNA 聚合酶 I 合成第 2 链(与第 1 链互补的 DNA)；

(3) 使用 T4 DNA 连接酶使 cDNA 与 *Sal* I 接头连接；

(4) *Sal* I 与 *Not* I 双酶切及小片段去除；

(5) cDNA 与载体连接；

(6) 转化进大肠杆菌。

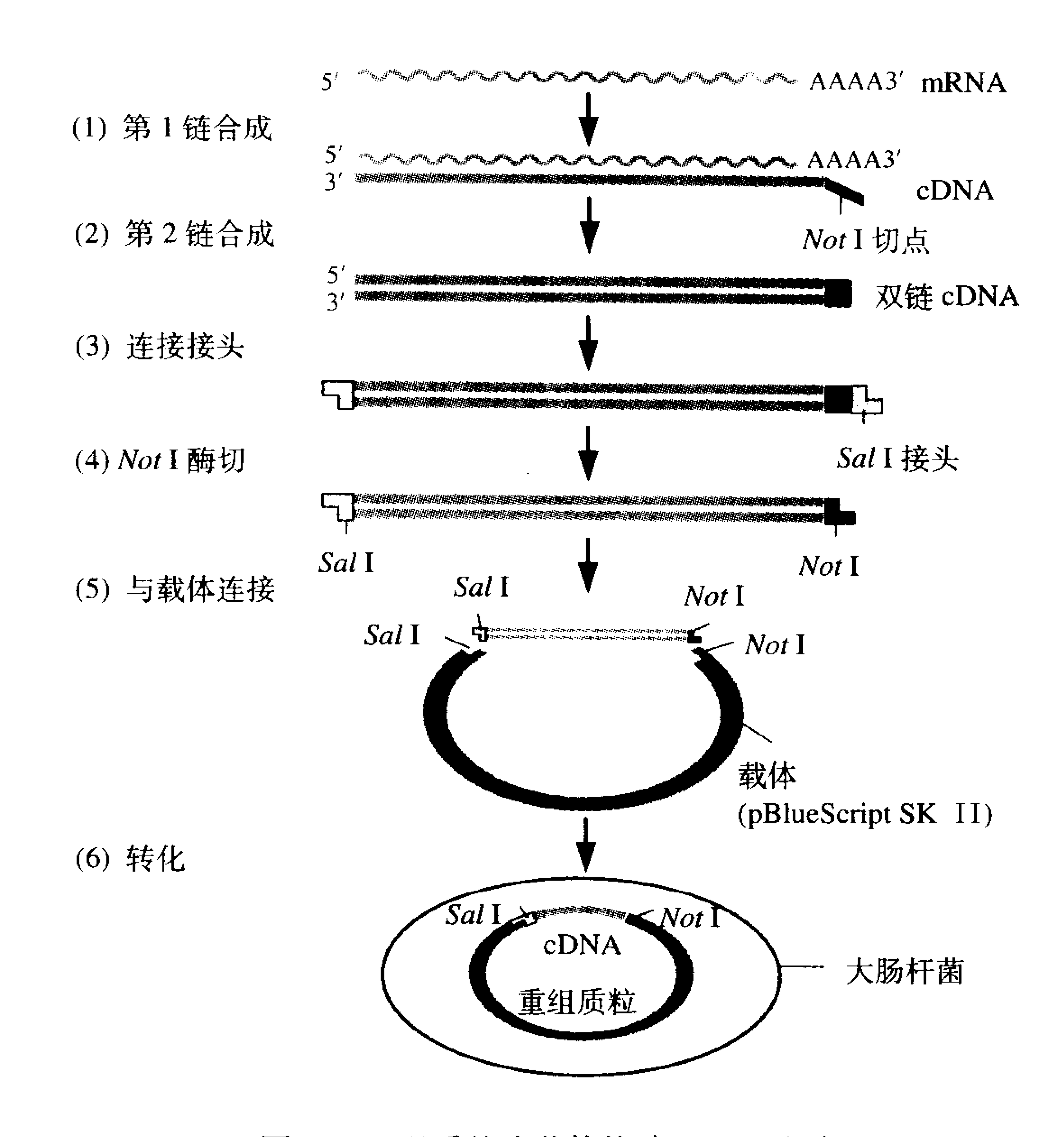


图 21-1　以质粒为载体构建 cDNA 文库

1. 第 1 链合成(第 1 步)

Materials

(1) 加热水浴锅

(2) 灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管

(3) 高质量 mRNA

(4) SuperScript Plasmid System (LifeTech 公司)

(5) DEPC 处理水(附录一)

(6) *Not* I · oligo(dT)引物(0.5 μg/μL)

(7) 0.1 mol/L DTT(附录一)

(8) 5×第 1 链缓冲液
250 mmol/L Tris · HCl(pH8.3)(附录一)
375 mmol/L KCl
15 mmol/L $MgCl_2$(附录一)

(9) 10 mmol/L dNTP 混合物(dATP、dCTP、dGTP、dTTP，各 10 mmol/L)

(10) SuperScript II 逆转录酶(200 U/μL)

Protocols　　　　Time：2 h

ⓐ 在 1.5 mL Eppendorf 管中加 2 μL(1.0 μg) *Not* I · oligo(dT)引物后，按下表添加 mRNA (1~5 μg)及 DEPC 处理水。

mRNA/μg	<1	2	3	4	5
mRNA 及 DEPC 处理水/μL	10	9	8	7	6

↓

ⓑ 70℃水浴中保温 10 min 后，冰上骤冷，轻甩，再添加以下溶液：

5×第 1 链缓冲液　4 μL

0.1 mol/L DTT　2 μL

10 mmol/L dNTP 混合物　1 μL

↓

ⓒ 混匀，轻甩，37℃预热 2 min 后，按下表量添加 SuperScript II 逆转录酶(200 U/μL)：

mRNA/μg	<1	2	3	4	5
SuperScript II 逆转录酶/μL	1	2	3	4	5

↓

ⓓ 混匀，轻甩，37℃保温 30 min 后，42℃再保温 30 min。

↓

ⓔ 转移至冰水中，终止第 1 链合成，继续第 2 链合成，或保存于−20℃(或−70℃)备用。

2. 第 2 链合成(第 2 步)

Materials

(1) 灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管

(2) 加热水浴锅

(3) SuperScript Plasmid System (LifeTech 公司)

(4) DEPC 处理水(附录一)

(5) 10 mmol/L dNTP 混合物(dATP、dCTP、dGTP、dTTP，各 10 mmol/L)

(6) 100%、70%预冷乙醇(*V/V*)

(7) 0.5 mol/L EDTA

(8) 苯酚/氯仿/异戊醇(25∶24∶1)(附录一)

(9) 5×第 2 链添加缓冲液

100 mmol/L Tris · HCl(pH6.9)(附录一)

450 mmol/L KCl 23 mmol/L $MgCl_2$(附录一)

0.75 mmol/L β-NAD^+

50 mmol/L $(NH_4)_2SO_4$

(10) *E.coli* DNA 连接酶(10 U/μL)

(11) *E.coli* DNA 聚合酶 I (10 U/μL)

(12) *E.coli* RNase H (60 U/μL)

(13) 7.5 mol/L NH_4Ac

Protocols　　Time：2 h

ⓐ 在第 1 步的第 1 链合成物(20 μL)中，添加以下溶液(按顺序添加，冰上操作)：

DEPC 处理水　91 μL

5×第 2 链添加缓冲液　30 μL

10 mmol/L dNTP 混合物　3 μL

E.coli DNA 连接酶(10 U/μL)	1 μL
E.coli DNA 聚合酶 I (10 U/μL)	4 μL
E.coli RNase H(60 U/μL)	1 μL
总体积至	150 μL

↓

ⓑ 混匀，轻甩，16℃保温 2 h (注意防止温度升高)。

↓

ⓒ 加 2 μL(10 U) T4 DNA 聚合酶，混匀，16℃继续保温 5 min。

↓

ⓓ 反应管置于冰上，加 10 μL 0.5 mol/L EDTA 和 150 μL 苯酚/氯仿/异戊醇，振荡混匀，室温、15 000 r/min 离心 5 min，取 140 μL 上清转至新管。

↓

ⓔ 加 70 μL 5 mol/L NH_4Ac 和 0.5 mL 100%预冷乙醇，上下颠倒混匀后，室温、15 000 r/min 离心 20 min。

↓

ⓕ 弃上清，沉淀中加 0.5 mL 70% 乙醇，室温、15 000 r/min 离心 2 min。

↓

ⓖ 弃上清，37℃保温 10 min，以蒸发残留乙醇。至此，第 2 链合成完成，或继续下一步操作，或保存于-20℃(或-70℃)备用。

3. 加接头(第 3 步)

Materials

(1) 加热水浴锅

(2) 灭菌 1.5 mL Eppendorf 管

(3) 灭菌水

(4) 适合载体的接头(1 μg/μL)

(5) T4 DNA 连接酶(1 U/μL)

(6) 7.5 mol/L NH_4Ac

(7) 70%、100%预冷乙醇(*V/V*)

(8) 0.5 mol/L EDTA

(9) 5×T4 DNA 连接缓冲液

250 mmol/L Tris · HCl(pH7.6)(附录一)

50 mmol/L $MgCl_2$(附录一)

5 mmol/L ATP

5 mmol/L DTT(附录一)

25%(*m/V*) PEG8000

(10) 苯酚/氯仿/异戊醇(25∶24∶1)(附录一)

Protocols　　　　Time：2 h

ⓐ 在第 2 步的第 2 链合成物(沉淀)中，按下列顺序添加溶液(冰上操作)：

灭菌水	25 μL
5×T4 DNA 连接缓冲液	10 μL
适合载体的接头(1 μg/μL)	10 μL

T4 DNA 连接酶(1 U/μL)	5 μL
总体积	50 μL

↓

ⓑ 混匀，轻甩，16℃保温 16 h 以上。

↓ O/N

ⓒ 在反应液中添加 50 μL 苯酚/氯仿/异戊醇，用旋涡混合器充分振荡混匀，室温、15 000 r/min 离心 5 min，取 45 μL 上清转移至新管。

↓

ⓓ 加 25 μL 7.5 mol/L NH_4Ac 和 150 μL 100% 预冷乙醇，上下颠倒混匀后，室温、15 000 r/min 离心 20 min。

↓

ⓔ 弃上清，沉淀中加 0.5 mL 70% 预冷乙醇，室温、15 000 r/min 离心 2 min。

↓

ⓕ 弃上清，37℃保温 10 min，蒸发残留的乙醇。至此，接头连接完成，或继续下一步操作，或保存于−20℃(或−80℃)备用。

4. *Not* I 酶切与小 cDNA 片段的去除(第 4 步)

Materials

(1) 灭菌水

(2) 10×*Not* I 添加缓冲液

(3) *Not* I

(4) 旋转柱

Protocols　　Time：2 h

ⓐ 在第 3 步接头连接物(沉淀)中，按以下顺序添加溶液(冰上操作)：

灭菌水	41 μL
10×*Not* I 添加缓冲液	5 μL
Not I	4 μL
总体积	50 μL

↓

ⓑ 混匀，轻甩，37℃保温 2 h。

↓

ⓒ 按“加接头”流程ⓒ~ⓕ步骤进行操作。

↓

ⓓ 琼脂糖凝胶电泳或用旋转柱去除较小的 cDNA 片段。

5. cDNA 与载体连接(第 5 步)

这里以 pBlueScript II SK 为载体进行说明。具体选择什么载体，视情况而定。

Materials

(1) 加热水浴锅
(2) 灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管
(3) T4 DNA 连接酶(1 U/μL)
(4) pBlueScript II SK, *Not* I-*Sal* I-cut(用 *Not* I、*Sal* I 酶切产物)
(5) 5×T4 DNA 连接缓冲液
250 mmol/L Tris · HCl(pH7.6)(附录一)
50 mmol/L $MgCl_2$(附录一)
5 mmol/L ATP
5 mmol/L DTT(附录一)
25%(*m*/*V*) PEG8000

Protocols　　Time: 2 h

ⓐ 在连接上接头的 cDNA(第 4 步)中，按下列顺序添加溶液：

5×T4 DNA 连接缓冲液	4 μL
pBlueScript II SK，*Not* I-*Sal* I-cut(50 ng/μL)	1 μL
cDNA(>1 ng/μL)	10 μL
用无菌水补足体积至	19 μL

↓

ⓑ 加 1 μL(1 U) T4 DNA 连接酶，混匀，轻甩，16℃保温 3 h。

↓

ⓒ cDNA 与载体连接完毕，继续下一步操作或保存于−20℃(或−70℃)备用。

6. 转化大肠杆菌(第 6 步)

用电转化法将载体与 cDNA 连接物转入大肠杆菌。常用菌株有 HB101、DH5α、XL1-Blue 等。具体操作见第八章。转化所得 cDNA 文库保存于 15%甘油中(−70℃)，备用。

第二节　以λ噬菌体为载体构建 cDNA 文库

其基本流程如图 21-2 所示，包括以下步骤：

(1) 用逆转录酶合成 cDNA 第 1 链(与 mRNA 互补的单链 DNA)；
(2) 用 RNase H 及 DNA 聚合酶 I 合成 cDNA 的第 2 链(与第 1 链互补 DNA)；
(3) 用 T4 DNA 连接酶在 cDNA 上接 *Sal* I 接头；
(4) *Sal* I 与 *Not* I 双酶切，去除小 cDNA 片段；
(5) cDNA 与载体连接；
(6) 包装反应(转入噬菌体)；
(7) 感染大肠杆菌。

步骤(1)~(4)与以质粒为载体构建 cDNA 文库的步骤完全相同，下列从第(5)步开始说明实验操作。

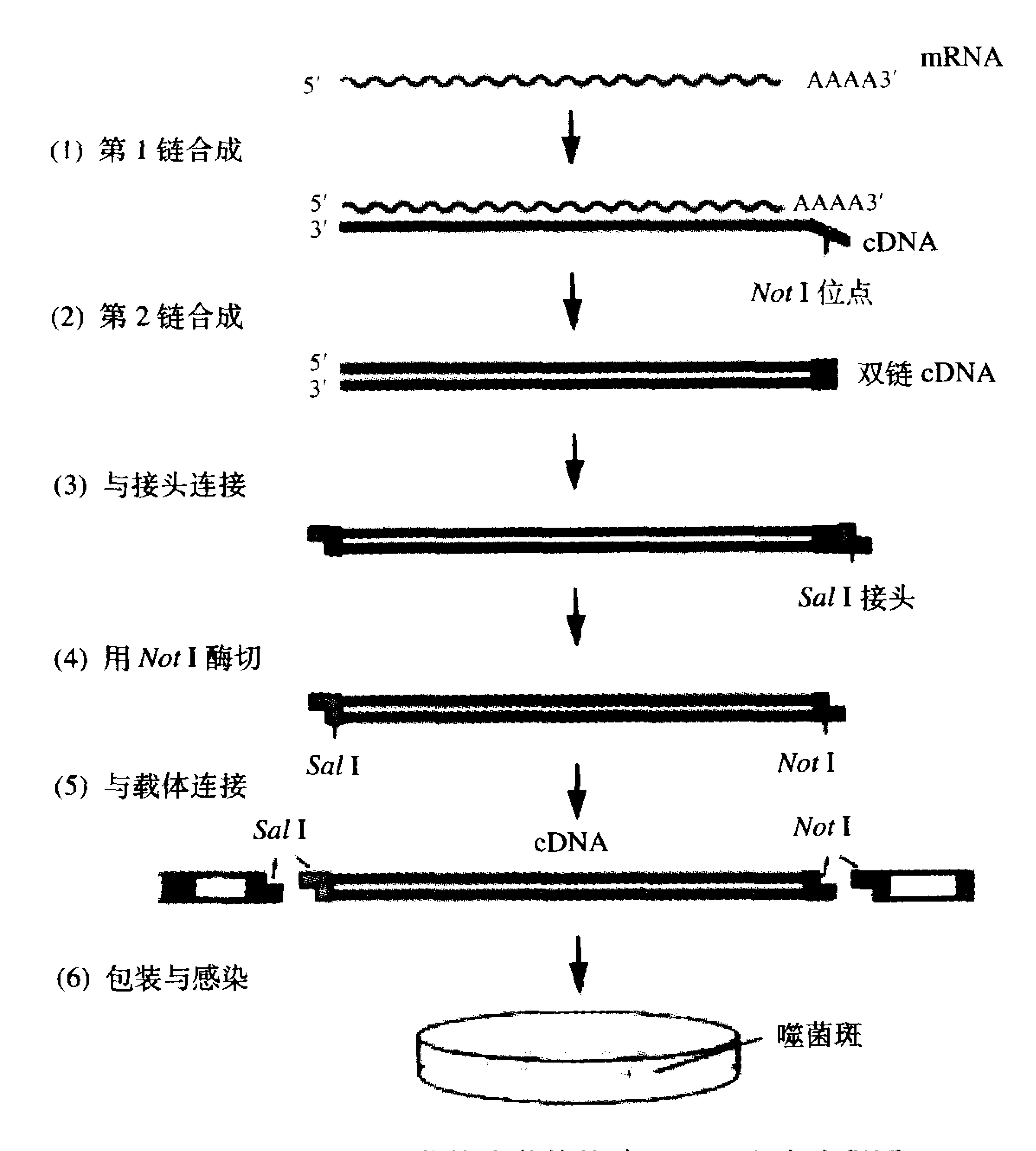


图 21-2　以 λ 噬菌体为载体构建 cDNA 文库流程图

1. cDNA 与载体连接(第 5 步)

常用噬菌体载体为插入型 λ 噬菌体，包括 λgt10、λgt II、λZAP II 3 种。可根据实验目的及筛选方法选择其中一种(表 21-1)。λ 噬菌体载体能插入的 cDNA 在 10 kb 以下，超过 10 kb 则很难重组。与质粒载体一样，噬菌体载体对长短 cDNA 的插入效率几乎相同，因此能得到丰度相同的全长 cDNA 文库。

表 21-1　用于构建 cDNA 文库的噬菌体载体

载体	大小/kb	插入容量/kb	插入位点数	筛选	融合蛋白	蓝白筛选	T3/T7启动子	体内重组	抗体筛选	推荐宿主菌
λgt10	43.3	~7.6	1(*Eco*R I)	–	–	×	×	×	×	C600
λgt II	43.7	~7.2	1(*Eco*R I)	–	*β*-gal	○	×	×	○	Y1088、Y1090r⁻
λZAP II	40.8	~10	6*	Amp^r	*β*-gal	○	○	○	○	XL1-Blue

注：* 多克隆位点同 pBlueScript II SK，常用酶切位点有 6 个：*Sal* I、*Not* I、*Xba* I、*Spe* I、*Eco*R I 和 *Xho* I。
○ 表示具有；× 表示不具有。

Materials

(1) λ 噬菌体 *Not* I-*Sal* I-cut(用 *Not* I、*Sal* I 酶切产物)　　(2) 其他试剂同质粒载体

Protocols Time：3.5 h

ⓐ 在第 4 步之ⓓ得到的接上接头的 cDNA 中，按下列顺序添加溶液(冰上操作)：

5×T4 DNA 连接缓冲液	4 μL
λ 噬菌体 DNA，*Not* I-*Sal* I-cut(500 ng/μL)	2 μL
cDNA(>1 ng/μL)	10 ng
用无菌水补足体积至	9 μL

↓

ⓑ 加 1 μL(1 U) T4 DNA 连接酶，吸打混匀，16℃保温 3 h。

↓

ⓒ cDNA 与载体连接完毕，继续下一步操作，或保存于−20℃(或−70℃)备用。

2. 包装反应(第 6 步)

Materials

(1) 包装用提取物(Gigapack® III Gold Packaging Extract)(Stratagene 公司)

(2) SM 缓冲液(附录一)

(3) 氯仿

Protocols Time：2.5 h

ⓐ 从−70℃冰箱中取出包装提取物数个，置于干冰上。

↓

ⓑ 用手指给包装提取物加热，稍微融化后立即置于冰上，进行下一步操作。



↓

ⓒ 迅速加入第 5 步ⓒ制作的连接液 1~4 μL 至包装提取物中。

↓

ⓓ 轻轻搅动管底，使之混匀，注意不要产生气泡。

↓

ⓔ 轻甩使之完全沉入管底，室温(22℃)反应 90 min~2 h[a]。

a. 不能超过 2 h。

↓

ⓕ 加 500 μL SM 缓冲液。

↓

ⓖ 加 20 μL 氯仿，吸打混匀。

↓

ⓗ 离心，上清转移至新管。

3. 效价分析(第 7 步)

Materials

(1) 大肠杆菌 C600(以 λgt10 为载体)、1090r⁻ 或 1088(以 λgt II 为载体)或 XL1-Blue(以 λZAP II 为载体)

(2) 10 mmol/L $MgSO_4$

(3) 0.2%麦芽糖

(4) LB 平板

(5) LB 顶层培养基

(6) 含 $MgSO_4$/麦芽糖的 LB 培养基

$MgSO_4$	0.6 g
麦芽糖[a]	1 g
LB	500 mL

高温高压灭菌

a. 麦芽糖在诱导噬菌斑形成中起作用。

Protocols　　Time：10 h

ⓐ 将合适菌株接种于 10 mL 含 $MgSO_4$/麦芽糖 LB 培养基上，37℃过夜培养。

↓ O/N

ⓑ 离心(500 *g*、10 min)收集菌体[b]。

↓

ⓒ 重悬于 5 mL、10 mmol/L $MgSO_4$ 溶液中，分装，制备感染用大肠杆菌[c]。

↓

ⓓ 在 100 μL 感染用大肠杆菌中加 1 μL 包装反应中止液，混匀后，用 SM 缓冲液稀释 100 倍，再取 1 μL 加到另一 200 μL 感染用大肠杆菌中。

↓

ⓔ 37℃保温 15 min。

↓

ⓕ 将ⓔ溶液加入到 3 μL 48℃保温 LB 顶层琼脂糖培养基中，混匀后立即铺于直径为 10 cm 的 LB 平板上[d]。37℃保温 8 h。

↓ O/N

ⓖ 统计菌落数，计算包装效率[e]。

b. 使用灭菌离心管。
c. 4℃下可保存 2 天。

d. LB 平板预热至 37℃，以防止平板过冷而使顶层培养基凝固过快。
e. 对于 2 μg λ DNA 的 20 μL 连接体系，若取 1~4 μL 包装物测定效价，则实际λ DNA 量为 0.1~0.4 μg，以菌斑数除以该 DNA 量，可计算出每微克 DNA 菌斑数，即包装效率。该值在 $5×10^5$~ $1×10^6$ 范围内较好。

4. 文库扩增(第 8 步)

得到完整 cDNA 文库后，应对文库进行扩增，这样可获取文库的永久源而被保存。扩增文库的滴度应为 10^9~10^{12} pfu/mL[a]。

a. pfu/mL 是 plaque forming unit/mL 的缩写。4℃下文库可保存数月，−70℃下可保存数年。若不扩增保存，滴度将迅速降低，这点应特别注意。

Materials

(1) 振荡器

(2) LB 平板(Φ = 15 cm)(附录一)

(3) 噬菌体感染用大肠杆菌

(4) LB 顶层培养基(附录一)

(5) SM 缓冲液(附录一)

(6) DMSO

Protocols　　Time：30 h

ⓐ 预培养感染用大肠杆菌。

↓

ⓑ 准备 5 支 15 mL 离心管，每管加 600 μL 感染用大肠杆菌及包装反应终止液(滴度约在 2×10^5)。注意设对照。

↓

ⓒ 37℃保温 15 min。

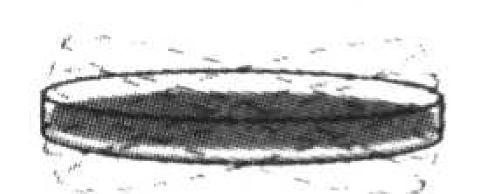
↓

ⓓ 在离心管中加 6.5 mL LB 顶层培养基[b]，充分混匀后，平铺于 LB 平板(Φ =15 cm)上，用手摇动使之均匀平铺。

b. LB 顶层培养基加入离心管后，应注意保温。



LB 顶层培养基加于
LB 培养基上



用振荡方式使顶层培养基
均匀平铺于平板上

↓

ⓔ 室温放置 20 min，使顶层培养基凝固[c]。

c. 必须确认是否已凝固。

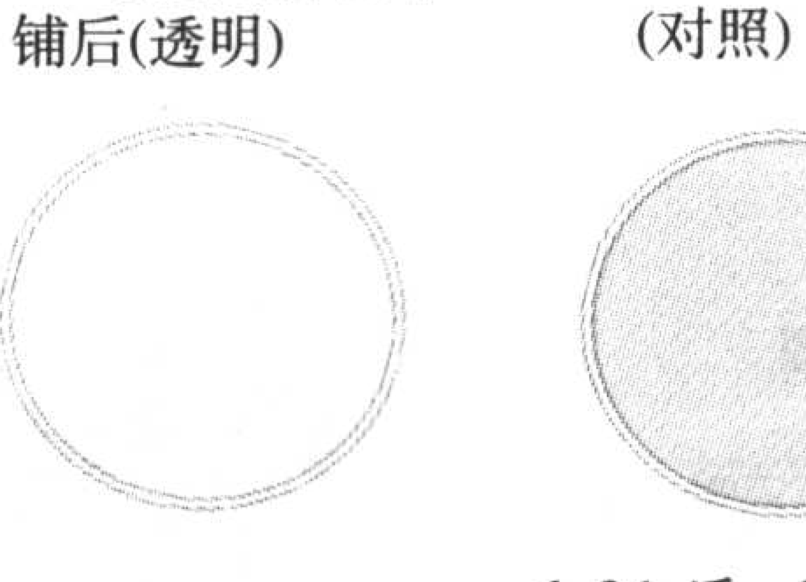
↓

ⓕ 37℃下培养 6~8 h 后将平板倒置，继续保温培养。

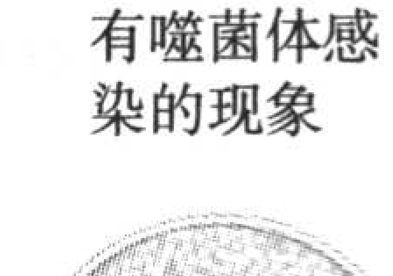
↓ O/N

ⓖ 直至菌斑长满整个平板。

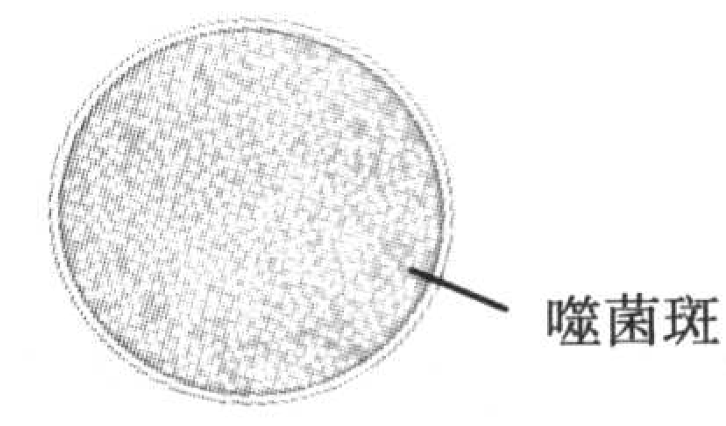
LB 顶层培养基平
铺后(透明)



仅见大肠杆菌
(对照)



有噬菌体感
染的现象



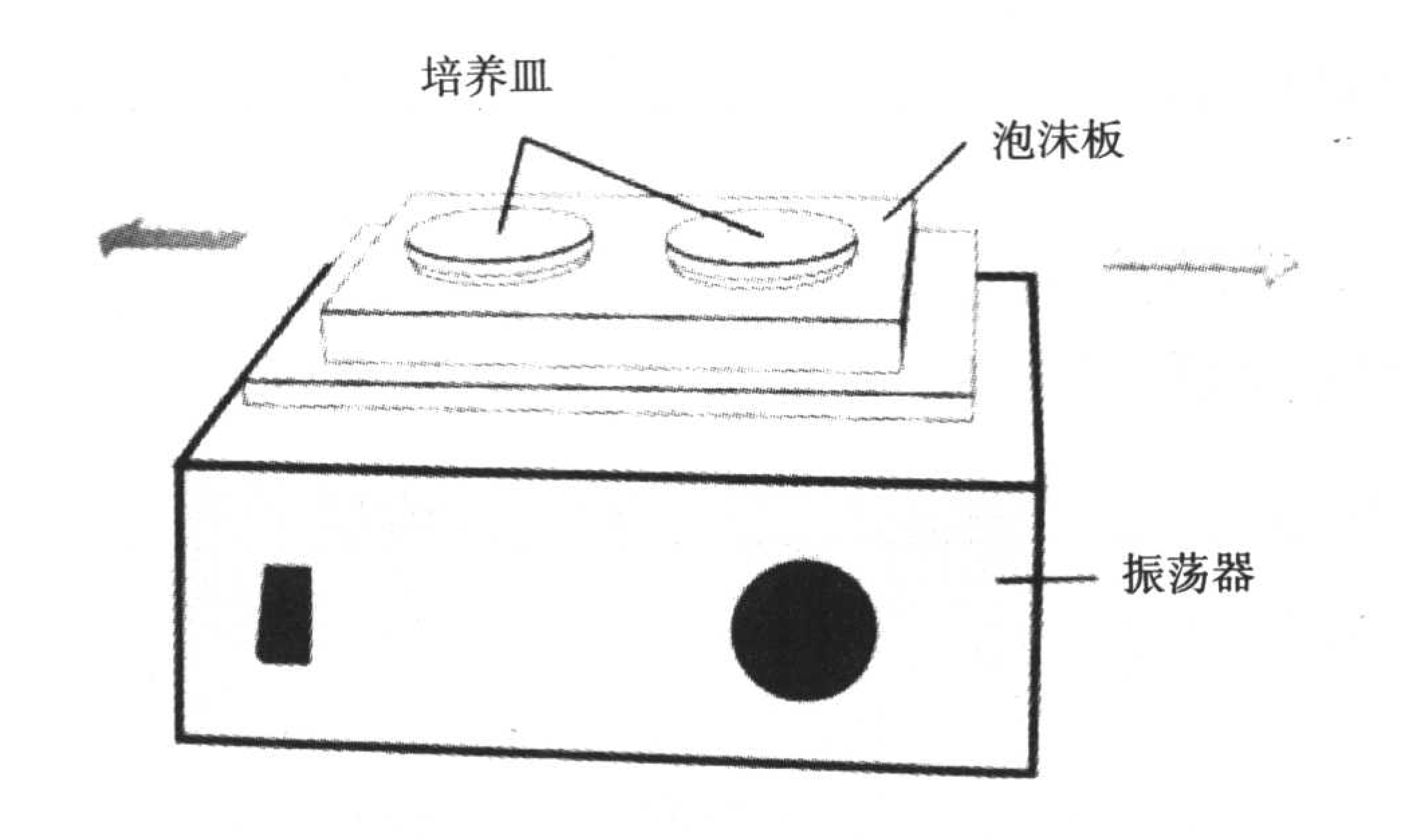
6~8 h 后，可见大肠
杆菌表面浑浊

再过 6~8 h 后，能观察到
分布均匀的噬菌斑

↓

ⓗ 每平板上加 10 mL SM 缓冲液，振荡器上缓慢振荡 12~14 h (4℃)[d]。

d. 使噬菌体溶于 SM 缓冲液中。



↓ O/N

ⓘ 回收SM缓冲液至离心管中，再用2 mL SM缓冲液漂洗平板，回收至离心管(合在一起)。

↓

ⓙ 加5%(*V/V*)氯仿于离心管中。

↓

ⓚ 充分混匀后，室温放置15 min。

↓

ⓛ 2000 *g* 离心10 min，去除菌体沉淀。

↓

ⓜ 上清转移至新管，再加氯仿使终浓度至0.3%。

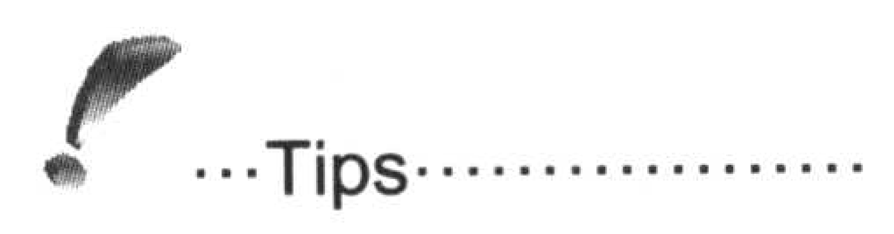
↓

ⓝ 再次检测文库滴度[e]。

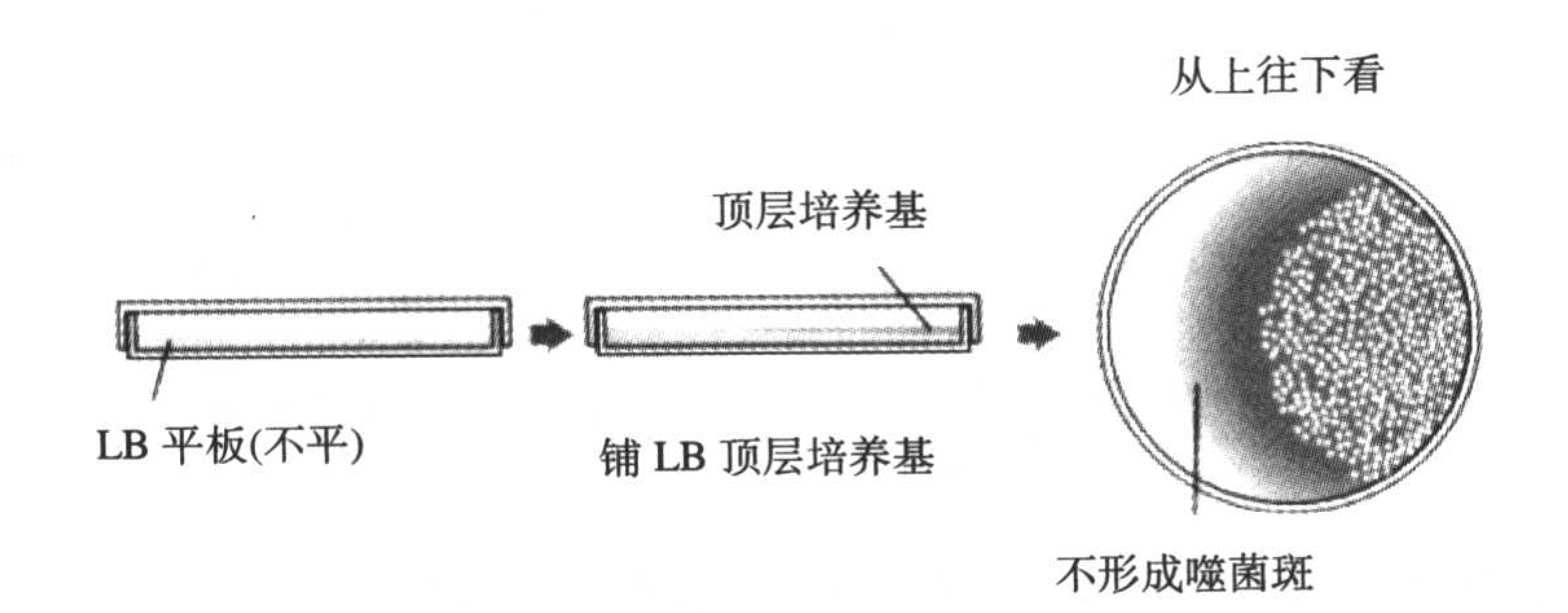
↓

ⓞ 4℃保存。若要长期保存，应加7% DMSO，再分装，并保存于−70℃[f]。

e. 文库滴度在10^9~10^{12} pfu/ mL为宜，低于此数不能用。
f. 反复冻融会使滴度下降。



文库滴度以10^9~10^{12} pfu/mL为宜，低于此数应考虑操作上是否存在问题。如下图所示，顶层琼脂培养基偏于一侧可导致菌斑数减少。此外，还应注意防止污染。例如，SM缓冲液的污染是经常发生的事情，应特别小心。测滴度时应注意设置对照。



? …Questions………………

1. 以质粒为载体和以噬菌体为载体构建 cDNA 文库在方法上有何异同?
2. 为什么高质量 mRNA 的提取是 cDNA 合成成败的关键?
3. 构建 cDNA 文库与构建基因组文库，在原理与方法上有何主要区别?
4. 如何从文库中分离出需要的目的基因?在材料的准备和操作上需要注意什么问题?
5. 在文库保存过程中，为什么滴度会降低?如何减少降低程度?
6. 如何保证文库的全面性?

第二十二章　RT-PCR

RT-PCR(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, 逆转录酶聚合酶链反应)是从RNA中扩增目的DNA的技术。其步骤是将RNA逆转录成第1链cDNA后，再以此cDNA为模板进行PCR(图22-1)。

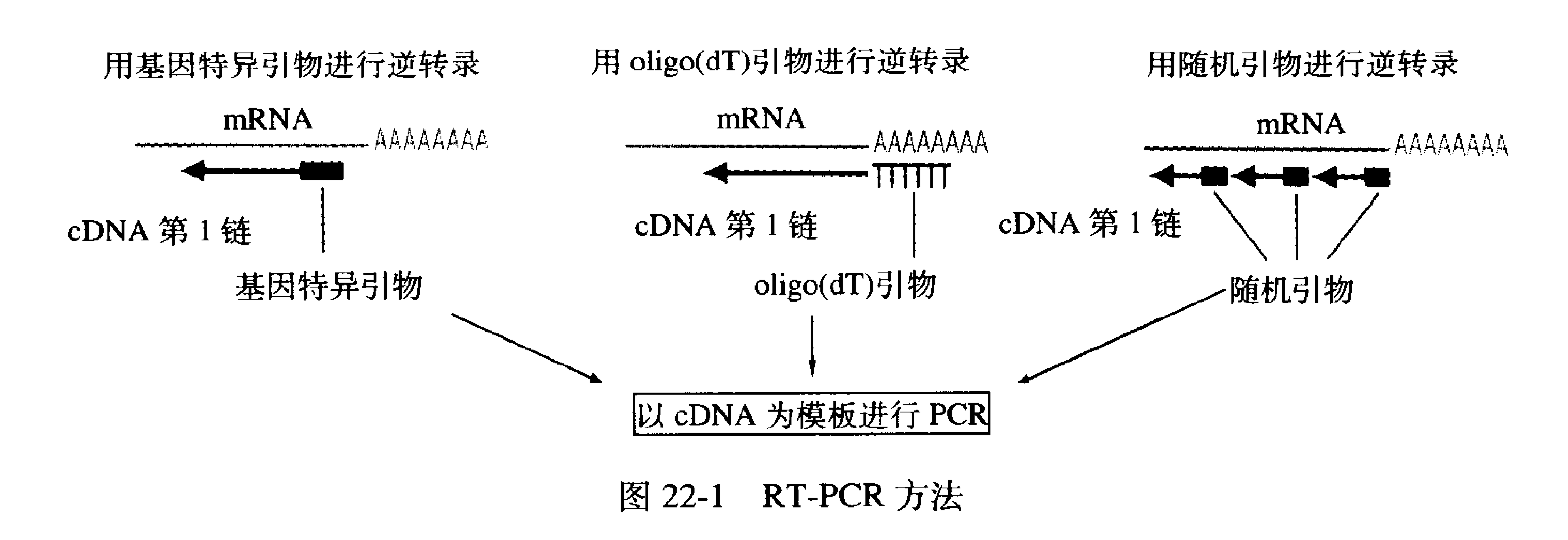


图22-1　RT-PCR方法

用于逆转录的酶有多种类型，主要有高温条件下进行逆转录的AMV(avian myeloblastosis virus，禽类成髓细胞瘤病毒)逆转录酶及具有校正功能的MMLV(moloney murine leukemia virus，莫洛尼氏白血病病毒)逆转录酶。高温下，RNA难以产生二级结构，逆转录容易进行，也提高了特异性。

逆转录用引物有3种类型：基因特异引物、oligo(dT)引物及随机引物。oligo(dT)引物及随机引物使众多mRNA逆转录成cDNA，特异性低，因此另外需要用特异引物才能扩增出目的基因。

1. RNA抽提

参考第十九章相关内容。

2. 逆转录

所有试剂、器械均应满足RNase-free要求。RNase极其稳定，极易混入反应体系中，因此应特别小心。

Materials

(1) RNase-free级台式离心机及PCR仪
(2) RNase-free级离心管及枪尖
(3) poly(A)$^+$ mRNA 0.2~1 μg(或总RNA 5~10 μg)
(4) 5×逆转录缓冲液(添加$MgCl_2$、DTT)
(5) 2.5 mmol/L dNTP
(6) 逆转录引物[特异引物、oligo(dT)引物、随机引物中的任何一种]
(7) 逆转录酶(AMV或MMLV、5 U/μL)
(8) RNase抑制剂(40 U/μL)
(9) RNA专用无菌水

ⓐ 按以下体系配制 RNA/引物溶液：

poly(A)$^+$ mRNA	0.2~1 μg (或总 RNA 5~10 μg)
引物(选择一种)	
基因特异引物	20 pmol
oligo(dT)引物	20 pmol
随机 9 mer 引物	50 pmol [a]
RNA 专用水	
总体积	10 μL

a. 其浓度随 cDNA 平均长度而变。

↓

ⓑ RNA/引物溶液在 70℃下保温 10 min，然后骤冷 [b]。

b. 目的是破坏 RNA 内部的二级结构。

↓

ⓒ 添加以下溶液：

RNA/引物溶液	10 μL
5×逆转录缓冲液	4 μL
RNase 抑制剂	1 μL
dNTP	4 μL
逆转录酶	0.25 U
总体积	20 μL

↓

ⓓ 按以下步骤进行反应 [c, d]：

42~60℃	30~60 min
98℃	5 min
4℃	∞

c. 由于随机引物较短，配对力较弱，最初反应温度应设为 30℃、10 min。

d. 使用 AMV 及特异引物，最初温度可设 60℃，以破坏二级结构，提高特异性。但对于内部二级结构不严重的 RNA，逆转录温度常用 42℃，再用 55℃温育 15 min。

↓

ⓔ 逆转录产物保存于–20℃，备用。

3. PCR 反应

以逆转录产物为模板进行 PCR 反应，与常规 PCR 相比，应特别注意以下几点：

1) 模板量

模板量过多，附带的逆转录引物也随之增多，因而不利于 PCR 反应。一般取 PCR 体积的 1/50 作为模板。若 PCR 结果不好，可适当增加模板量(如 1/20)。

2) 特异性

RT-PCR 很容易产生非特异性扩增，因此 PCR 引物应尽可能提高其 T_m 值，并用 Shuttle PCR(双温 PCR)、Touch-down PCR(梯度降温 PCR)或 Hot Start(热启动)模式。



RT-PCR 问题解析

现象	可能原因	解决方法
电泳中未见或微弱可见 RT-PCR 产物	RNA 被降解	变性胶上检测 RNA 完整性
		使用好的 RNA 提取技术或使用试剂盒
	RNA 中含有逆转录抑制剂	用乙醇重新沉淀 RNA 以去除抑制剂(SDS、EDTA、甘油、焦磷酸钠、亚精胺、甲酰胺、胍盐等)
	多糖与 RNA 共沉淀	使用 LiCl 法沉淀 RNA 以除去多糖
	合成 cDNA 第 1 链的引物配对性差	重新设计或合成引物
		换用其他引物
	起始 RNA 量不够	增加 RNA 量
		对于小于 50 ng RNA 样品,在第 1 链合成中加 0.1~0.5 μg 乙酰 BSA
	RNA 模板二级结构过多	将 RNA 和引物在不含盐及缓冲液条件下变性/退火
		提高逆转录反应温度
	引物或模板对残余 RNA 敏感	PCR 前用 RNase H 处理
	靶序列在被分析组织中不表达	尝试其他靶序列或组织
	PCR 灵敏度问题	参照 PCR 问题解决方法
电泳中观察到非预期条带	形成引物二聚体	重新设计引物
	引物与模板非特异退火	增加退火温度，减少退火时间
		开始几个循环中使用较高退火温度,然后使用较低退火温度
		使用热启动 PCR 方式
	污染其他 DNA 或 RNA	使用抗气雾剂的枪尖
	PCR 特异性问题	参照 PCR 问题解决方法
电泳中产生弥散条带	第 1 链产物含量过高	常规 PCR 反应中减少第 1 链产物的量
	DNA 被 DNase 降解成短片段，并产生非特异性扩增	提高 RNA 质量，防止 DNA 污染
	PCR 问题	参照 PCR 问题解决方法

…Questions…

1. RT-PCR 与普通 PCR 的反应体系及程序有何主要区别?
2. 常用于 RT-PCR 的两种逆转录酶在性能及效果上有何区别? 为此在实验方案设计上各应注意什么?
3. 如何根据你所设计的实验方案使用合适的 RT-PCR 引物?
4. 为什么有时在 RT-PCR 方案中使用了 RNase H? 是否可用其他种类的 RNase 代替?
5. 导致 RT-PCR 不出现预期带的原因有哪些? 请针对你设计的实验进行分析。
6. 在 RNA 提取过程中,如何避免多糖与 RNA 共沉淀? 共沉淀的多糖对 RT-PCR 有什么影响?

第二十三章　RACE

RACE(rapid amplification of cDNA end，cDNA 末端快速扩增)，是一种快速扩增 cDNA 的 5′ 端或 3′ 端序列的技术。获取 5′ 端序列的 RACE 称为 5′ RACE，获取 3′ 端序列的 RACE 称为 3′ RACE。

第一节　5′ RACE

获取全部 5′ 端序列是非常困难的。因为合成第 2 链 cDNA 时，引物以外的部分是不能扩增的(Okayama-Berg 法除外)。但利用 5′ 端“附加序列”与下游已知序列设计引物进行 PCR，能扩增出 5′ 端未知序列(图 23-1)。

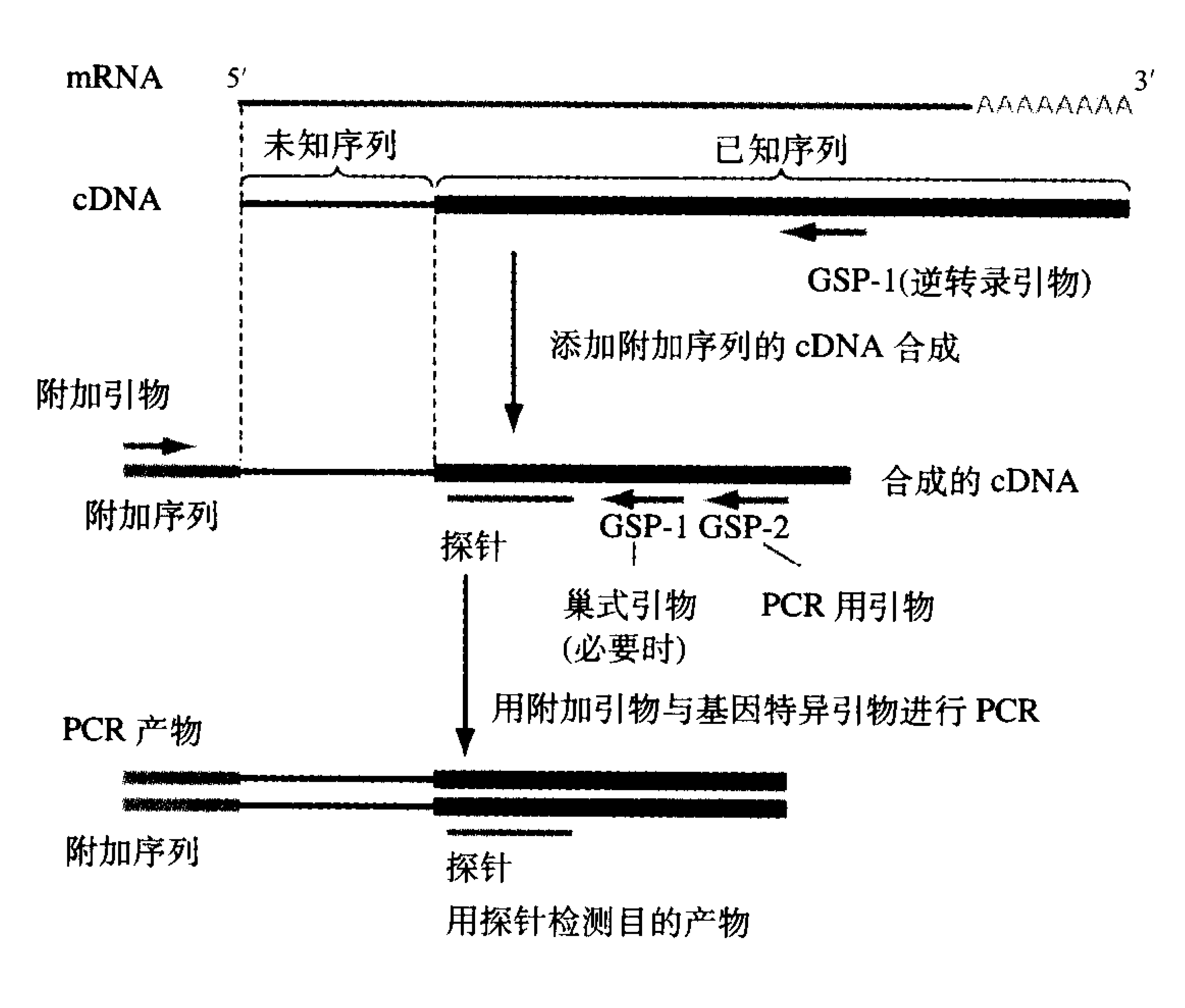


图 23-1　5′ RACE

1. 利用 TdT 的 5′ RACE

末端脱氧核糖核酸转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase，TdT)是一种在 DNA 3′ 端上添加核苷酸的酶，简称末端转移酶。与 DNA 聚合酶不同的是，其催化的聚合反应不需要模板指导，而且 4 种 dNTP 中的任何一种都可作为它的底物。因此，反应混合物中只有一种 dNTP(A、C、G 或 T 中的任何一种)时，可以形成同聚物尾巴，如图 23-2 的 poly(dC)。以此同聚物尾巴为随机引物，与基因特定引物一起 PCR 就可完成 5′ 端序列的扩增。

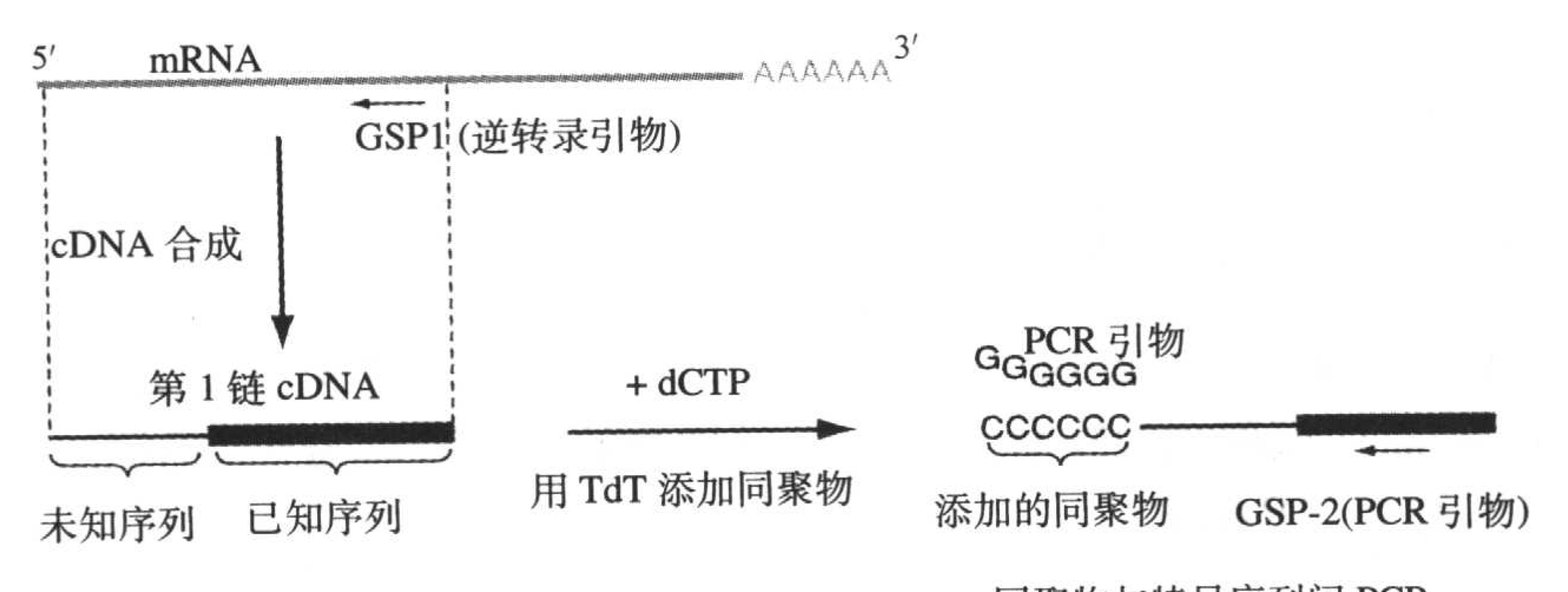


图 23-2　用 TdT 开展的 5′ RACE

2. 逆转录

逆转录流程如第二十二章所述,使用的 RNA 最好为 poly(A)$^+$ mRNA,推荐量为 1 μg。

3. 引物的去除

残留的逆转录引物对随后进行的同聚物添加反应有影响，因此必须去除残留的逆转录引物。可采用玻璃珠柱的方法去除。这里介绍凝胶过滤柱(cDNA 旋转柱，Amersham Pharmacia Biotech 公司)的使用方法。

Materials

(1) 低速离心机
(2) 乙醇沉淀相关器械和试剂
(3) cDNA 样品(逆转录产物)
(4) cDNA 旋转柱
(5) PCR 专用水或 TE

Protocols　　Time：30 min

ⓐ 1 μg poly (A)$^+$mRNA 所得逆转录物溶于 100 μL 双蒸水中。

↓

ⓑ 将旋转柱上下颠倒数次，使凝胶悬浮。

↓

ⓒ 摘掉柱子上、下两个帽，流走其中的液体 [a]。注意不要使凝胶干裂。

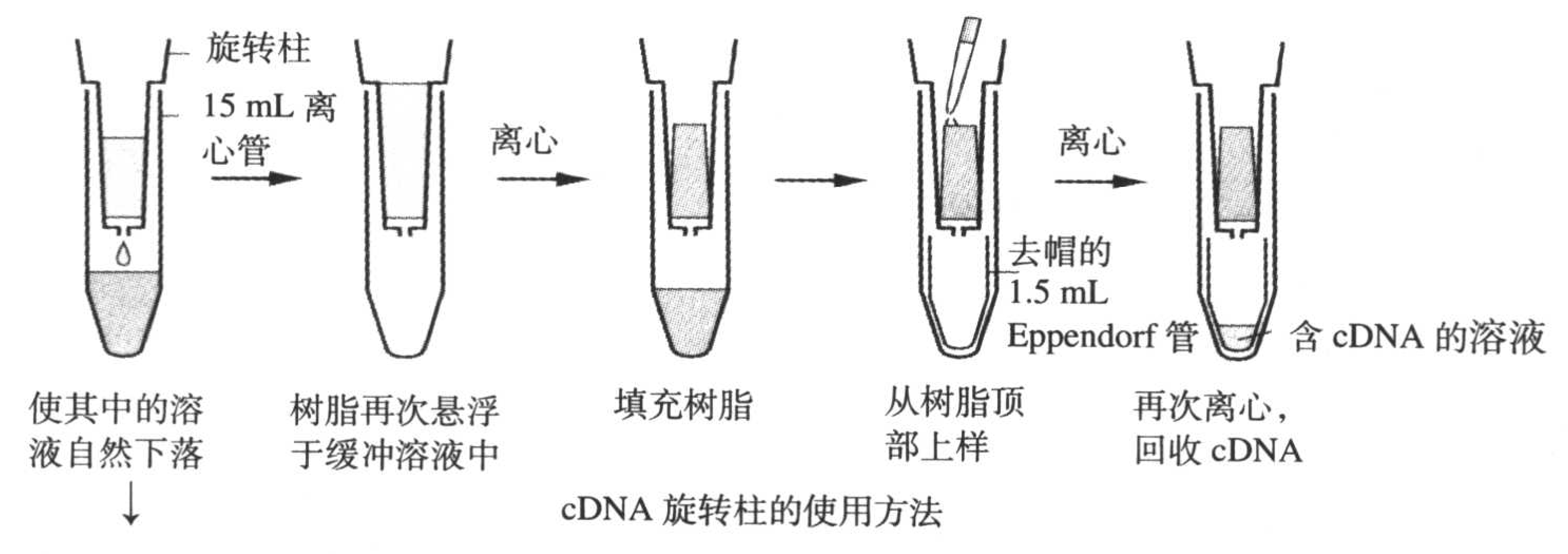
a. 立于 15 mL 离心管中，大约需要 15 min。

↓

ⓓ 液体流完后，加 2 mL PCR 专用水或 TE 于柱中，再盖上上、下两个帽，上下颠倒使凝胶再次悬浮。

↓

ⓔ 摘掉上下两个帽，立于 15 mL 离心管中，直接用低速离心机(400 *g*)室温离心 2 min，使凝胶沉于柱底部。



cDNA 旋转柱的使用方法

↓

ⓕ 柱子转移至一新的、去帽的 1.5 mL Eppendorf 管上。

↓

ⓖ 缓慢点样于凝胶“顶部”。

↓

ⓗ 室温下低速(400 *g*)离心 2 min。

↓

ⓘ 将 1.5 mL Eppendorf 管里的上清转移至新管。

↓

ⓙ 加 1/10 体积 3 mol/L NaAc 和 2.5 倍体积预冷乙醇，4℃下 14 000 r/min 离心 5~10 min。离心后去除上清，用 70% 乙醇漂洗沉淀。干燥沉淀。

↓

ⓚ 干燥的 cDNA 沉淀溶于 90 μL 无菌双蒸水中。

4. 同聚物加尾

Materials

(1) PCR 仪
(2) cDNA 样品(已去除引物)
(3) 10 mmol/L dCTP(或 dTTP、dGTP、dATP)
(4) 末端转移酶(TdT)
(5) 5×TdT 添加缓冲液
(6) PCR 专用水

Protocols　　　　Time：40 min

ⓐ 配制以下反应液：

5×TdT 添加缓冲液	5 μL
cDNA 样品	18 μL
10 mmol/L dCTP	1 μL(终浓度为 0.4 mmol/L)
总体积	24 μL

↓

ⓑ 98℃加热 1 min 后冰上骤冷。

↓

ⓒ 加 1 μL TdT(20 U/μL)。

↓

ⓓ 37℃保温 10 min。

↓

ⓔ 70℃加热 10 min，使 TdT 失活。

↓

ⓕ 加水至 200 μL，–20℃保温(可保存数月)。

↓

ⓖ 取 1~10 μL 用于 PCR。

5. PCR 反应

以反义链设计特异引物，以正链设计寡聚引物进行 PCR。如添加 dA 尾的引物为 oligo(dT)，添加 dC 尾的引物为 oligo(dG)[a]。在 RACE 中进行 PCR 时，应注意以下几点：

a. 用 oligo(dA)或 oligo(dT)为引物时，长度为 25 mer；用 oligo(dC)或 oligo(dG)为引物时，长度为 15 mer。

(1) 分别比较 4 种不同同聚物的结果：添加何种同聚物，对于不同目的基因的结果可能不同。尽可能同时分别添加 4 种不同同聚物以获取最长的 PCR 产物。

(2) 使用不同同聚物扩增，反应程序不同：oligo(dA)/oligo(dT)的 T_m 值极低，而 oligo(dG)/oligo(dC)的 T_m 值极高，因此，前者退火温度应设较低值(50℃附近)，后者可用 Shuttle PCR(双温 PCR)或 Touch- down PCR(梯度降温 PCR)来提高其特异性。

(3) 若有必要，可考虑巢式 PCR：若 Northern 印迹能检测出来，但 PCR 扩增不出来，可考虑巢式 PCR。

(4) 尽量采用高保真酶：克隆未知序列时，为确保其正确扩增，应尽量使用 α 型或混合型高保真酶[b]。

b. 即使是高保真酶，也应测定多个克隆子序列，以确保序列正确。

6. PCR 产物的检测与回收

不仅仅是 TdT 法，所有 5′ RACE 或 3′ RACE 的 PCR 产物电泳都呈现一定的带型不清晰现象[a]，这也许是因为有多个转录起始或终止位点，或过多的非特异性扩增所致。因此，必须利用 Southern 印迹来确定扩增条带是否是需要的目的基因(图 23-3)。

a. 即使是清晰的带型，也不能肯定全都是目的基因。

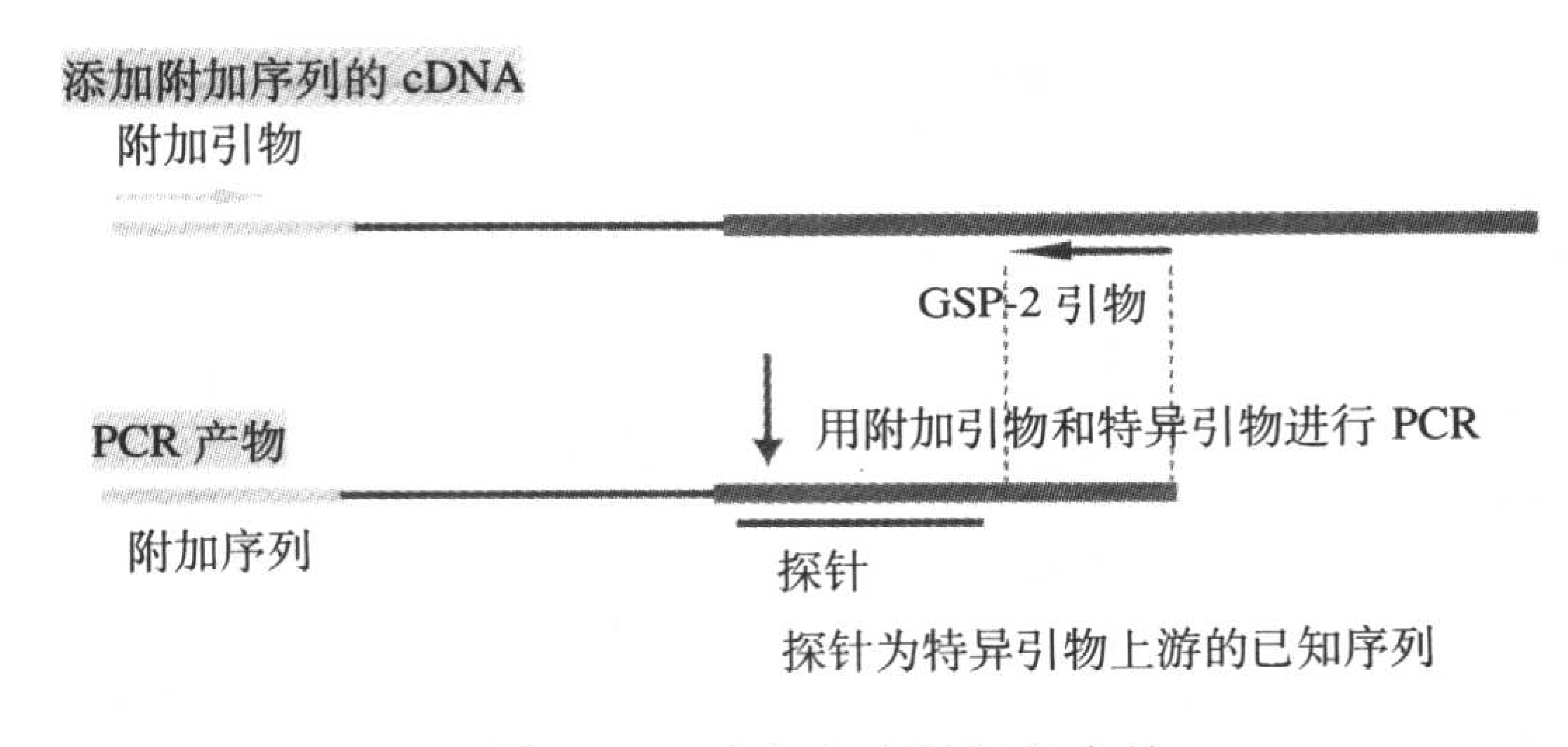


图 23-3　确定杂交探针的方法

Materials

(1) 琼脂糖凝胶电泳及回收相关器械　　(2) 琼脂糖凝胶电泳及回收相关试剂

(3) Southern 印迹相关器械

(4) PCR 样品

(5) Southern 印迹相关试剂

Protocols Time：琼脂糖凝胶电泳 30 min，Southern 印迹 2~3 d，胶回收 1~3 min

ⓐ 取 1/10~1/5 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳(尽可能取 4 种不同添加同聚物的 PCR 产物在同一琼脂糖凝胶中电泳)。

↓

ⓑ EB 染色，照相。

↓

ⓒ 凝胶转膜。注意不要忘记做标记。

↓ O/N

ⓓ 标记探针，杂交，特异带检测(可能需要过夜曝光)[b]。

↓ O/N

ⓔ 比较 X 射线片与电泳照片，分析杂交位置，尽可能从 4 种不同添加同聚物中选择分子质量最大的带。

↓

ⓕ 选择合适的同聚物扩增产物，电泳回收目的带。若电泳带拖尾，分别回收最靠近区域的 DNA 及临近区域的 DNA(图 23-4)。

b. 若过夜曝光也不能检测出来，则需要考虑提高 PCR 效率。

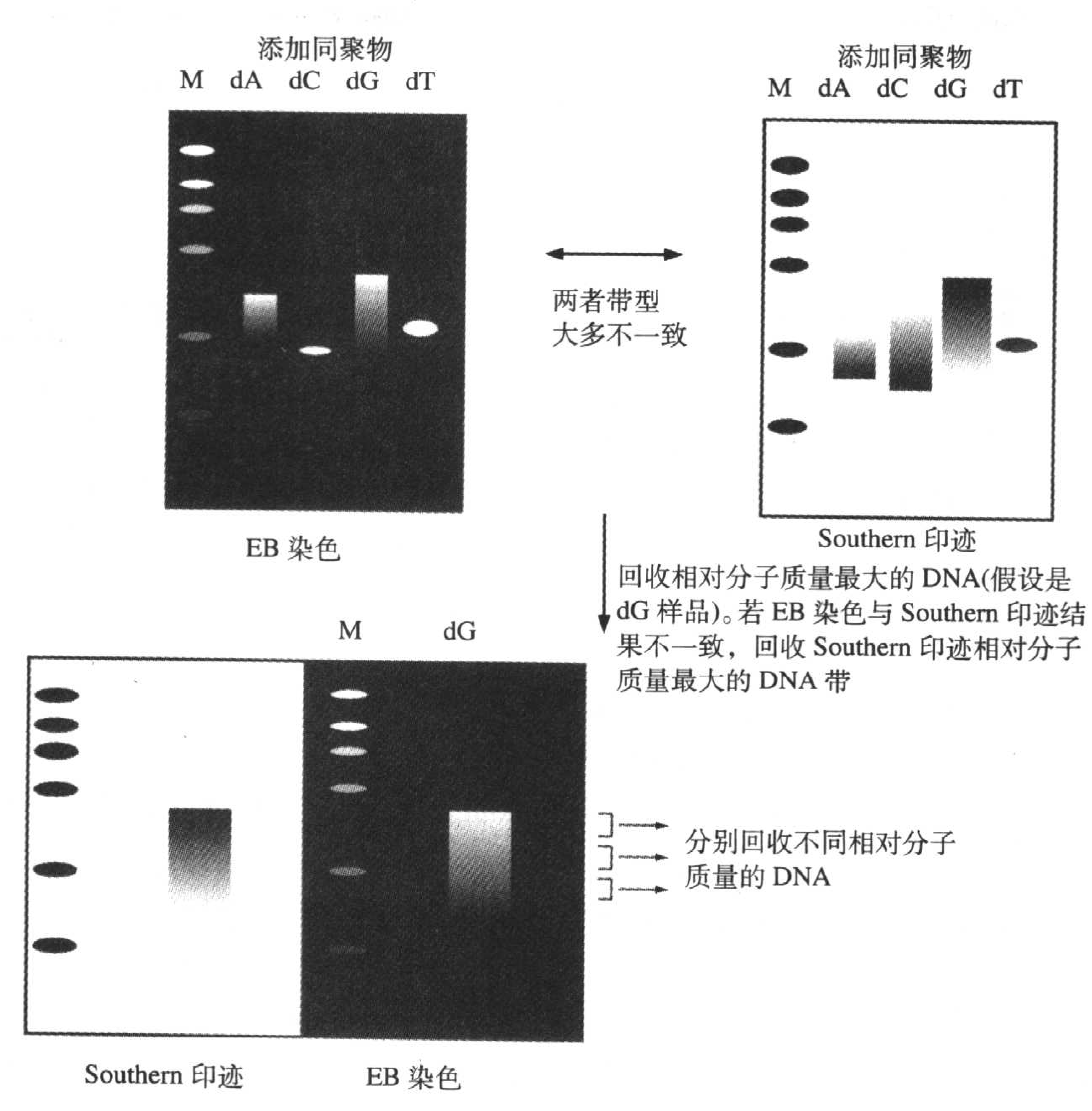


图 23-4 RACE 产物的检测与回收

↓

⑧ 用回收 DNA 进行重组，筛选菌落。若需进一步确认，可进行菌落杂交，或菌落 PCR。

第二节　3′ RACE

3′ RACE 的原理基本上等同于 RT-PCR。以 oligo(dT)为引物，将 mRNA 逆转录成 cDNA，以该 cDNA 为模板，以基因特异引物和 oligo(dT)为引物进行 PCR (图 23-5A)。由于 oligo(dT)特异性较低，因此，逆转录时常在 oligo(dT)引物 5′ 端上添加一些附加碱基，以此附加序列及基因特异序列设计引物进行 PCR(图 23-5B)。为快速分离目的基因，在 PCR 引物内侧常设计探针进行 Southern 印迹或菌落杂交。

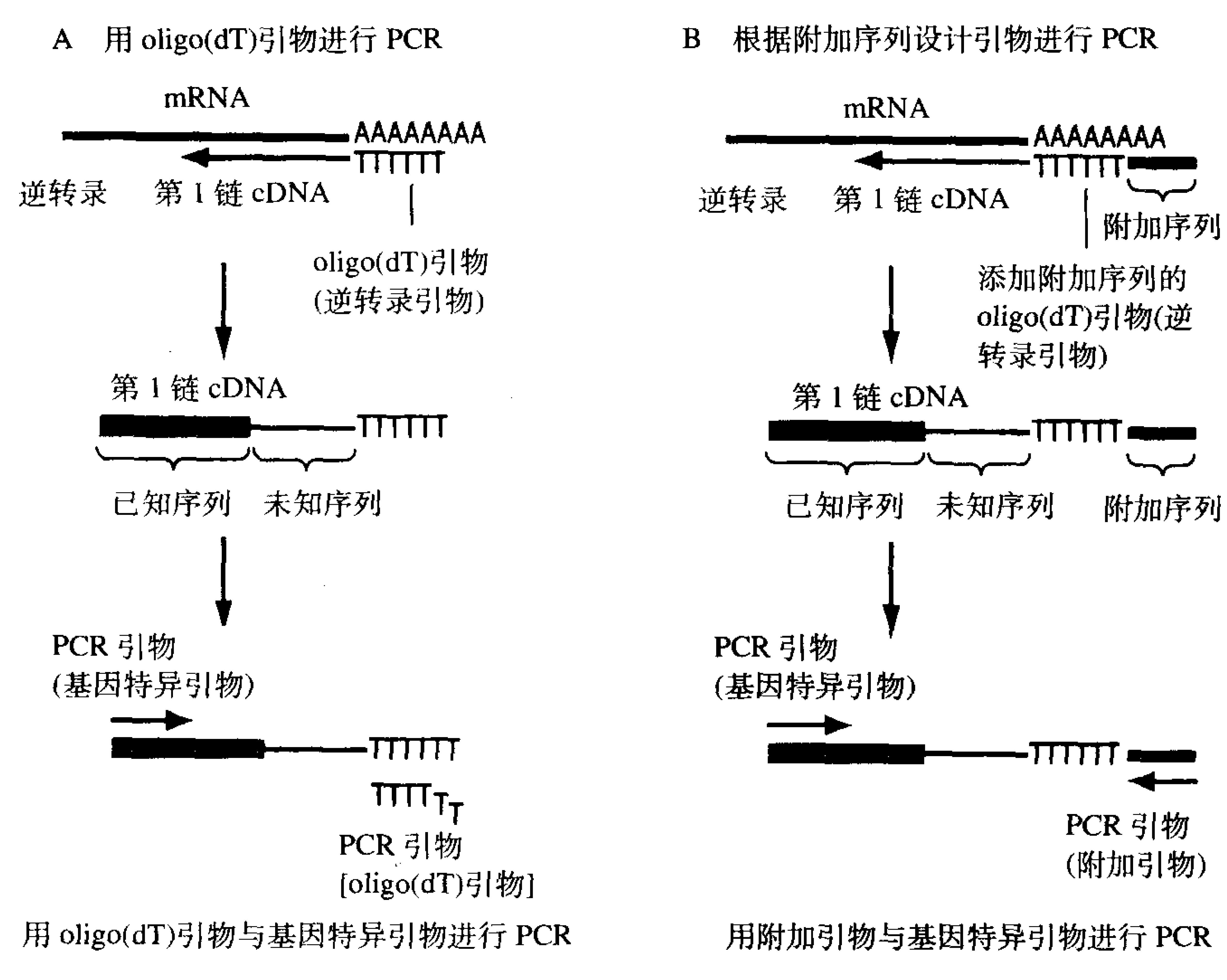


图 23-5　3′ RACE 的原理

…Questions………………

1. 什么叫 RACE 技术？如何获取 5′ RACE？
2. 如何获取全长 cDNA 序列？请设计实验流程。
3. 5′ RACE 技术与 3′ RACE 技术有何区别？根据 5′ RACE 流程设计 3′ RACE 方案是否可行？
4. 在 RACE 技术中为什么必须去除引物？如果不进行该操作或去除不彻底，将会有什么后果？
5. 为什么在 RACE 技术的相关 PCR 中，需要同时进行 4 种不同同聚物的扩增？
6. 在 RACE 技术的相关 PCR 中，使用低保真酶(如 *Taq* DNA 聚合酶)将会有什么后果？

第二十四章　转 录 分 析

在研究特定基因功能时，分析其转录模式是不可缺少的实验之一。基因在何种组织或细胞中得以转录？基因转录与细胞分化及发育之间有何关系？外部刺激对基因转录产生什么影响？正常组织与异常组织在基因转录模式上有何异同？这些问题都需要分析基因转录情况。

近年常用于基因转录模式分析的主要技术有点印迹、Northern 印迹、RT-PCR、RNase 保护分析等。作为定量分析的 RT-PCR 仪器也已开发出来，因此转录分析已进入定量研究的新时期，各技术特征如表 24-1 所示。

表 24-1　各种转录分析方法的基本特征

方法	灵敏度	定量	简易性	经济性	特征
点印迹	△	△	◎	○	能同时处理多个样品
Northern 印迹	△	○	△	○	能推测全长 mRNA 大小，能选择性地检测是否存在拼接及基因家族，但转录量低时难检测
RNase 保护分析	○	◎	○	◎	特异性高，能检测突变和拼接，但无法知道探针外的变化
RT-PCR	◎	×~△	○	◎	灵敏度高，但条件优化、引物设计较困难；能定量，但确定合适循环数较困难
实时 PCR	◎	○	◎	×~△	是 RT-PCR 实时检测方法，定量性好，但仪器较昂贵
DNA 微矩阵分析	△	△~○	◎	△	分析矩阵上的基因非常方便，但能分析的目的基因非常有限
DNA 芯片	△~○	○	◎	×	检测仪器及芯片制作较昂贵

注：◎：最高；○：次之；△：再次之；×：最差。

第一节　Northern 印迹

在分析基因转录上，Northern 印迹能获取许多有用的信息，如目的基因 mRNA 的大小、转录的细胞部位。其原理见图 24-1。

RNA 是单链分子，分子内碱基配对产生复杂的二级结构，因此不能用正常的琼脂糖凝胶电泳来指示其分子大小。但是，凝胶中若加入甲醛或乙二醛等变性剂，RNA 泳动迁移率就与其分子大小成比例。将这种泳动模式的 RNA 分子转移至杂交膜，再与探针杂交，就可知样品中是否存在 RNA，转录量如何，RNA 分子大小是多少。

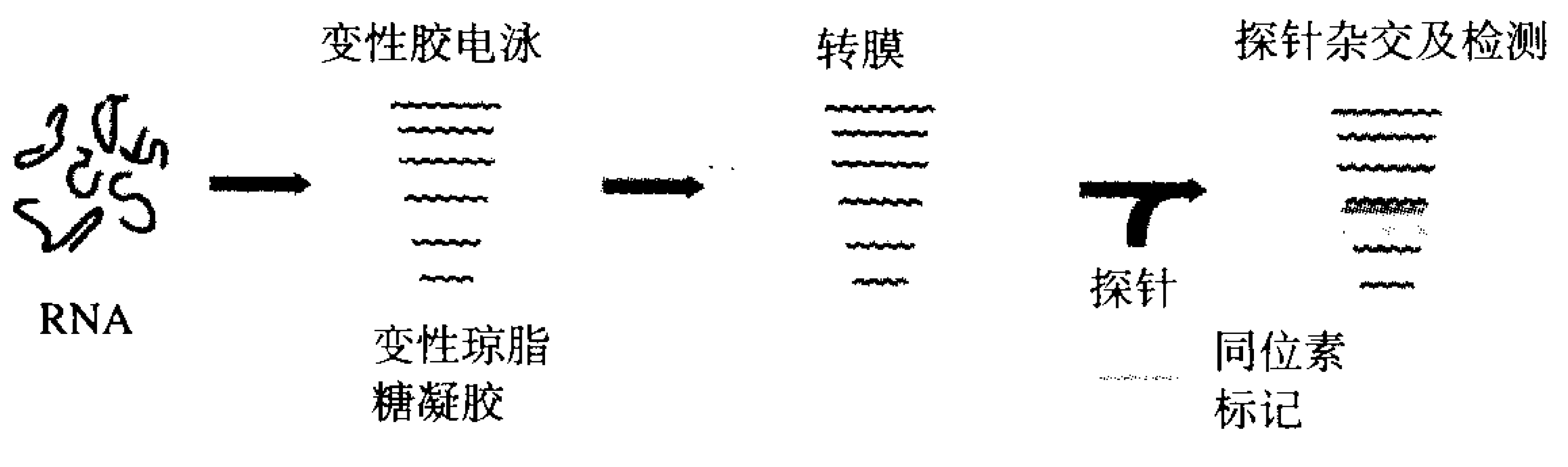


图 24-1　Northern 印迹原理

Northern 印迹检测灵敏度不如 RNA 保护分析，但杂交膜经处理可再与其他基因探针杂交以检测其他基因的转录情况，杂交温度适当降低后，还可检测同源基因的转录或基因家族的转录。

1. 电泳与印迹

Materials

(1) 用于 RNA 电泳的电泳槽及配套装置

(2) 恒温箱(65℃)

(3) 台式离心机

(4) 1.5 mL Eppendorf 管

(5) 耐热瓶

(6) 烧杯

(7) 紫外灯

(8) 吸水纸

(9) 印迹缓冲液(常用 20×SSC)

(10) 样品缓冲液 A

去离子甲酰胺	8.5 mL
37%甲醛	2.5 mL
10×MOPS 缓冲液	2.0 mL
总体积	13 mL

分装成每管 650 μL，−70℃保存[a]

a. 样品缓冲液 A、B 在−70℃下可保存 1 年。

(11) 样品缓冲液 B

甘油	1.0 mL
1%溴酚蓝	0.8 mL
RNA 用双蒸水	1.2 mL
总体积	3 mL

分装成每管 150 μL，−70℃保存[a]

(12) 10×MOPS 缓冲液(附录一)

(13) 1 mg/mL EB(RNA 专用)(附录一)

(14) 37%甲醛

(15) RNA 相对分子质量标准物

(16) 尼龙膜(amersham pharmacia biotech 公司的 Hybond-N)

Protocols　　Time：1 d

(1) 甲醛变性凝胶的制备[b]

ⓐ 在耐热瓶中加 1.0 g 琼脂糖[c]，然后加 84.5 mL RNA 专用水，继而用微波炉熔解琼脂糖[d]。

↓

ⓑ 待瓶底冷却至手可触摸的温度(50~60℃)时，加 10 mL 10×MOPS 缓冲液和 5.5 mL 37%甲醛，充分混匀后制备凝胶。

b. 这里介绍的是 100 mL 1.0%琼脂糖凝胶的制备方法。凝胶浓度根据检测 RNA 相对分子质量大小而定。4 kb 以上用 0.8%~1.0%，2 kb 以下用 1.3%~1.5%。但甲醛变性凝胶强度低于普通凝胶，因此不能低于 0.8%。

c. 用干热灭菌药匙取。

d. 微波炉加热时应在瓶口盖上纸盖，以防水蒸气挥发。

(2) 样品准备与电泳

ⓐ 准备 0.3~2 μg poly(A)$^+$ RNA 或 10~30 μg 总 RNA，溶于 4 μL 水中(若浓度较稀，用乙醇沉淀法浓缩)。相对分子质量标准物的操作相同。

↓

ⓑ 将凝胶置于电泳槽中，加 1×MOPS 缓冲液。

↓

ⓒ RNA 样品中加以下试剂：

样品缓冲液 A	13 μL
样品缓冲液 B	3 μL
1 mg/mL EB	1 μL

↓

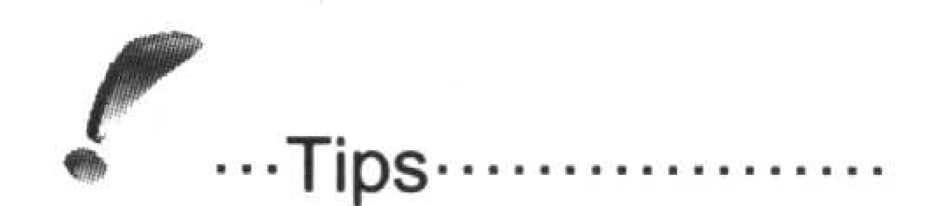
ⓓ 65℃加热 10 min 后，冰上骤冷以破坏其二级结构。

↓

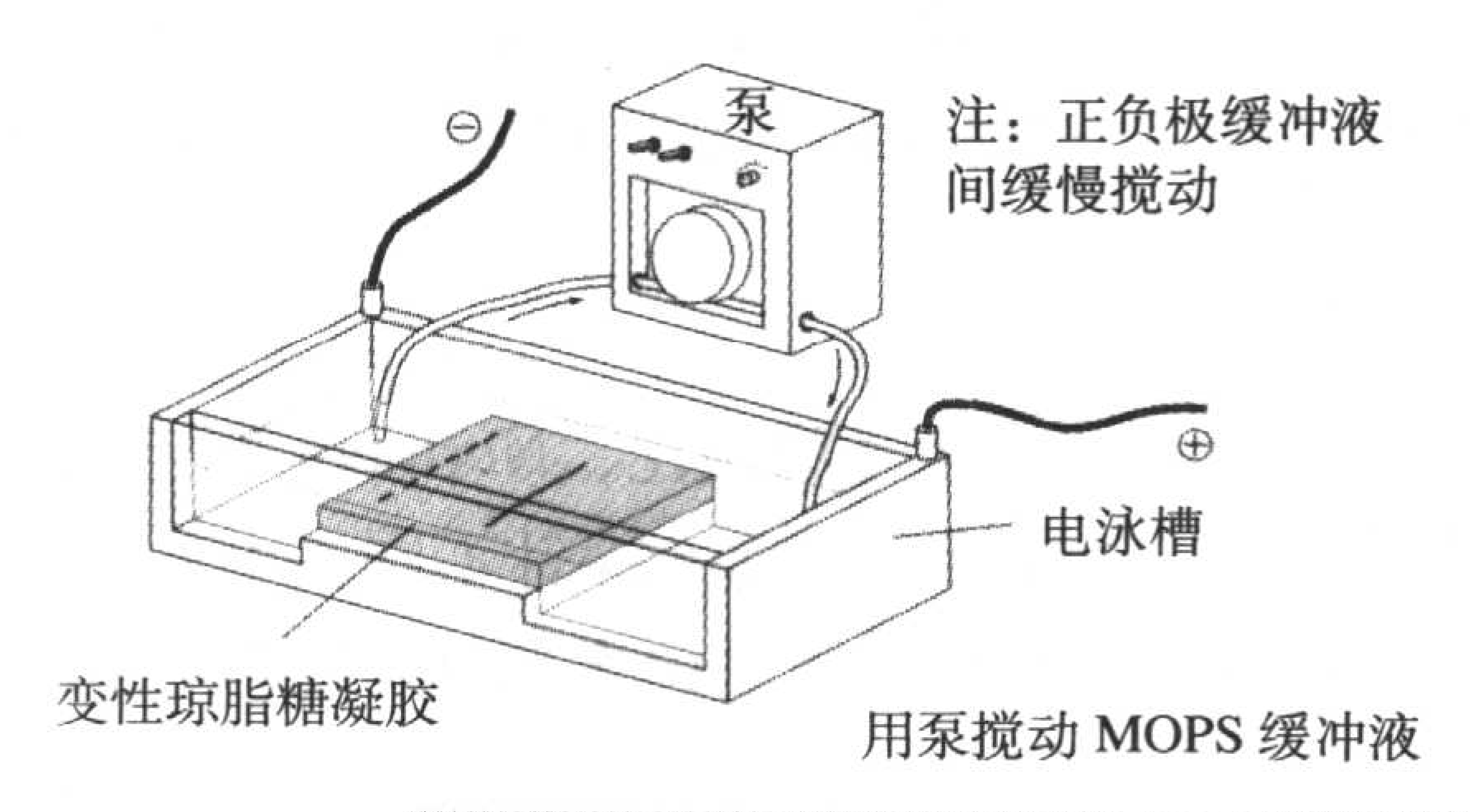
ⓔ 轻甩，使样品集于管底，上样。

↓

ⓕ 设置电场强度为 5 V/cm，电泳 3~4 h。待溴酚蓝跑至 2/3 处终止电泳。



MOPS 缓冲液的泳动较慢，这是因为 MOPS 缓冲能力极弱，正、负极离子的平衡易被打乱。因此，常常用注射器吸取正极的缓冲液至负极，或负极缓冲液移至正极，或用泵使正负极缓冲液循环。这样能确保一定的泳动速率(见右图)。



用泵搅动 MOPS 缓冲液

(3) 印迹

ⓐ 样品缓冲液中混有 EB[e]，因此可直接在荧光下观测。

e. 电泳后用 EB 染色，因凝胶中含有甲醛而染色极慢。

↓

ⓑ 先在白瓷缸中加入 20×SSC，凝胶取出后小心转入 20×SSC 中，振荡 15 min 后更换 SSC，再振荡 15 min[f]。同时准备毛细管转移装置(参考 Southern 印迹流程)。

f. 目的是去除甲醛，因为甲醛会妨碍转膜。

↓

ⓒ 过夜转移(约 10 h)。常用尼龙膜时，转移缓冲液是 20× SSC[g]。缓冲液种类参考膜使用说明书。

g. 不能按 Southern 印迹方法那样进行碱变性，否则 RNA 全被降解掉。

↓ O/N

ⓓ 转移完毕，在膜上用圆珠笔做出正确标记。紫外检测膜与凝胶以估测转移效率。

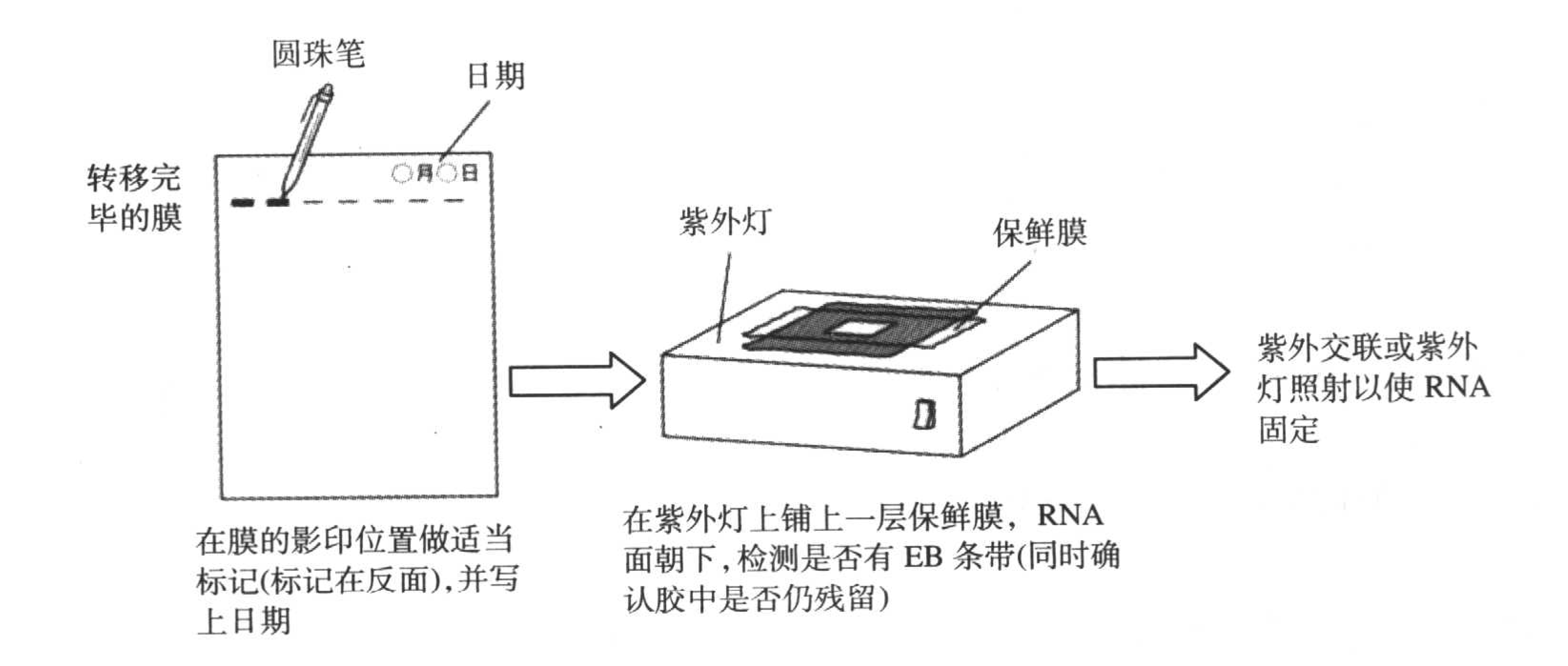
↓

ⓔ 紫外交联或用紫外灯照射 5 min 使 RNA 固定于膜上[h]。

h. 最好优化紫外灯下的照射时间，但大致为 5 min。

↓

ⓕ 将膜装入塑料袋内干燥保存。



2. 杂交

Northern 印迹的过程与 Southern 印迹基本相同，如探针标记方法、杂交缓冲液组成、洗膜条件等全部相同。但以下几个方面有其特殊性，应注意。

1) 探针去除

与 Southern 印迹膜相比，Northern 印迹膜再次被杂交的可能性较小。只有前一探针信号消失，新探针又与前一探针不同，才有可能再次杂交。如果前一探针信号仍然残留，或者使用的是发光的非同位素探针，则应该用下面介绍的方法去除前一探针。

Materials

洗液

1 mol/L Tris · HCl (pH7.5) (附录一)	10 mL
10% SDS(附录一)	10 mL
双蒸水	980 mL
总体积	1 L

Protocols　　Time：1 d

ⓐ 用微波炉将洗液加热沸腾[a]。

a. 加热时务必松开盖子。

↓

ⓑ 为了不使胶干燥，置于盛有少量沸腾双蒸水的白瓷缸中。

↓

ⓒ 将洗液倒入盛有膜的白瓷缸中。取洗液时注意戴上厚的绒手套，以免烫伤手。

↓

ⓓ 振荡，使之降至室温。

↓

ⓔ 将膜转至杂交袋中，并封口。垫上一张 X 射线片，曝光。检测探针是否已洗掉。

↓

ⓕ 如确定探针已被洗掉，该膜在−20℃下可直接保存在杂交袋中 1 年。

2) 杂交缓冲液

市售的杂交缓冲液可保存 1 年，因此给实验带来了许多便利。但这样的缓冲液不宜用于带正电荷的膜，因为背景太深。由于 Northern 印迹常用带正电荷的膜，因此不能使用市售的用于 Southern 印迹的杂交缓冲液。下面推荐的杂交缓冲液，室温下可保存 6 个月，杂交温度为 65℃。

用于 Northern 印迹的杂交缓冲液：

0.5 mol/L Na_2HPO_4	136.8 mL
0.5 mol/L NaH_2PO_4	63.2 mL
BSA	5 g
双蒸水	35 g
总体积	500 mL

(1) 先将 0.5 mol/L Na_2HPO_4 和 0.5 mol/L NaH_2PO_4 混合；

(2) 边加 BSA 边搅拌，直至 BSA 全部溶解[b]；

(3) 加 SDS，加热至 50℃辅助 SDS 溶解；

(4) 全部溶解后，用双蒸水定容至 500 mL。

室温下可保存半年。若出现 SDS 析出，加热溶解即可。

b. SDS 溶解后，BSA 可能仍不溶，因此应注意配制顺序。

第二节 RNase 保护分析

RNase A 降解单链 RNA，不降解双链 RNA，利用这一特性开发出了 RNase 保护分析技术。待测的 RNA 与 ^{32}P 标记 RNA 探针杂交，若形成 RNA-RNA，则被保护起来，不能形成双链的部分则被 RNase A 降解掉，电泳检测仅见双链 RNA(图 24-2)。

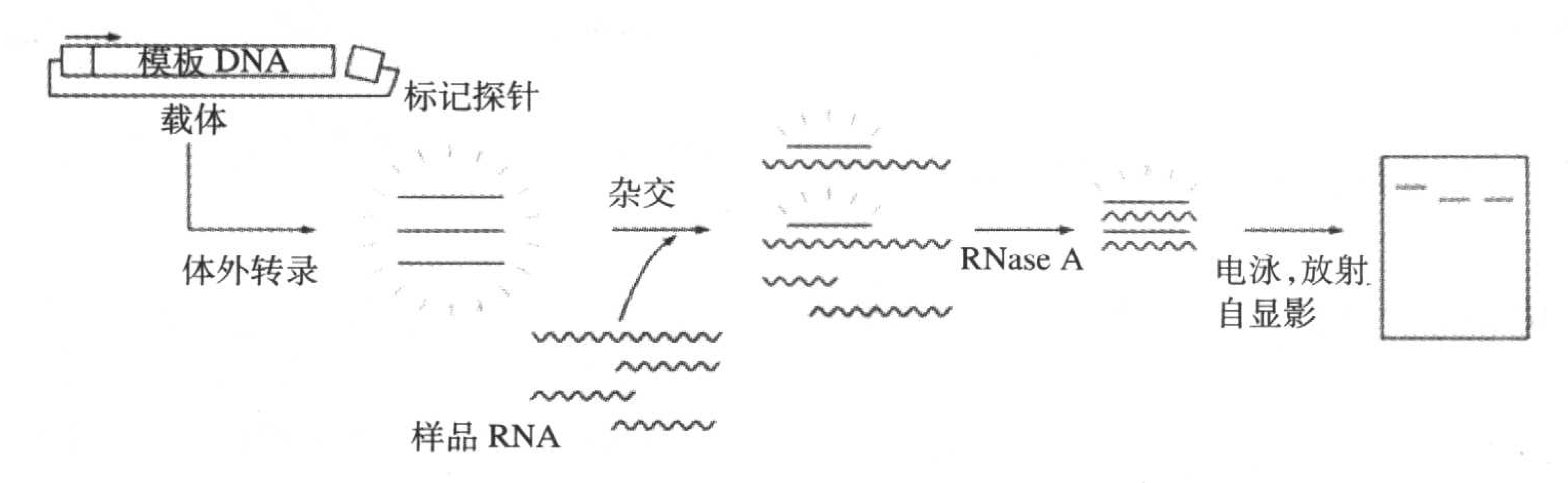


图 24-2　RNase 保护分析的原理

RNase 保护分析广泛应用于基因转录的定量分析，转录起始位点、终止位点或拼接点 mRNA 的结构分析，突变位点或多态位点的检测等领域。

Materials

(1) 恒温水浴锅(95℃、42~56℃、37℃)　　(2) 台式离心机

(3) 电泳装置

(4) X 射线片

(5) 3 MM 滤纸

(6) RPA II 试剂盒(Ambion 公司)

包括杂交缓冲液、酵母总 RNA、RNase 缓冲液、RNase 失活/RNase 沉淀液、点样缓冲液、探针缓冲液、RNase 及 5 mol/L NH_4Ac

(7) 3 mol/L NaAc(附录一)

(8) 预冷 100%乙醇和 70%乙醇(RNA 专用)

(9) 苯酚/氯仿/异戊醇(25∶24∶1，RNA 专用)(附录一)

(10) 10×TBE(附录一)

(11) 10%过硫酸铵(APS)

(12) TEMED

(13) RNA 探针(1×10^8~1×10^9 cpm/μg 比活性)[a]

(14) 样品 RNA [b]

(15) 5%丙烯酰胺/8 mol/L 尿素

尿素	240 g
丙烯酰胺	23.75 g
N, *N'*-亚甲双丙烯酰胺	1.25 g
10×TBE	50 mL

用双蒸水定容至 500 mL(避光保存阴凉暗处)

(16) 2% 硅化液

二甲氯化硅树脂	2 mL
氯仿	98 mL

易燃，通风橱内配制，保存于黑暗阴凉处

a. 探针长度宜在 150~600 bp，可用 T7、T3、SP6 RNA 聚合酶体外转录而成。转录后进行酚抽提和乙醇沉淀等操作后即可直接使用。但最好先用 DNase I 消化后再进行 5%丙烯酰胺/8 mol/L 尿素变性电泳，回收标记带，以降低背景。

b. 一般为 10 μg 总 RNA，或 0.1~1 μg poly$(A)^+$ RNA。若检测量低，可进一步增加 RNA 量(最大量在 50 μg 以下)。

Protocols　　Time：2 d

(1) 样品 RNA 与探针杂交(5~24 h)

ⓐ 样品 RNA 与 5×10^4 cpm RNA 探针一起加入到 Eppendorf 管，进行乙醇沉淀 [c, d]。

↓

ⓑ 乙醇挥发完毕后的沉淀物溶于 20μL 杂交缓冲液中。

↓

ⓒ 90~95℃下保温 3 min，以使 RNA 变性 [e]。

↓

ⓓ 用旋涡混合器混匀后，轻甩，使之沉入管底。

↓

ⓔ 42~56℃下静置 12~18 h，使之杂交 [f]。

↓ O/N

ⓕ 用 RNase 缓冲液稀释 RNase 100 倍 [g, h, i]。

↓

ⓖ 轻甩杂交反应管，将稀释 RNase 加入杂交反应管，混匀。

↓

c. 适宜的 RNA 探针量应为目的 RNA 量的 3~10 倍。

d. 乙醇沉淀方法：加 1/10 体积 5 mol/L NH_4Ac 和 2.5 倍体积预冷 100%乙醇，−20℃下静置 15 min，4℃、15 000 r/min 离心 15 min，弃上清，沉淀用 70%预冷乙醇漂洗(所有操作应为 RNase-free)。

e. Eppendorf 管盖打开时，注意防止污染。

f. 根据探针长度、GC 含量及是否产生二级结构确定杂交温度。条件未知时，推荐用 42℃。

g. RNase 浓度随目标 RNA 而异，在 1/1000~1/10 稀释范围内摸索反应浓度。

h. 若目的 RNA 富含 AU，由于 RNase A 易识别 C、U，灵敏度被提高，这时可降低反应温度；或不用 RNase A/RNase T1 混合酶，而仅用 RNase T1(识别 G)。

i. 从这一步开始，不用注意 RNasefree，但要注意同位素操作安全。

ⓗ 37℃静置 30 min，消化未杂交的单链 RNA。

↓

ⓘ 加 30 μL RNase 失活/RNase 沉淀液，以终止 RNase 反应。

↓

ⓙ −20℃静置 15 min，4℃、15 000 r/min 离心 15 min，弃上清[j]。

j. 当探针较短时，为提高乙醇的沉淀效率，可多加 100 μL 乙醇或酵母总 RNA，而且不必进行 70%乙醇漂洗。

k. 推荐用测序胶板，凝胶越大分离效果越好，能得出较好的杂交图谱。

↓

ⓚ 沉淀溶于 5 μL 点样缓冲液中，混匀。

(2) 准备 5%丙烯酰胺/8 mol/L 尿素凝胶[k]。

ⓐ 用双蒸水或乙醇擦拭用于制作凝胶的玻璃板。

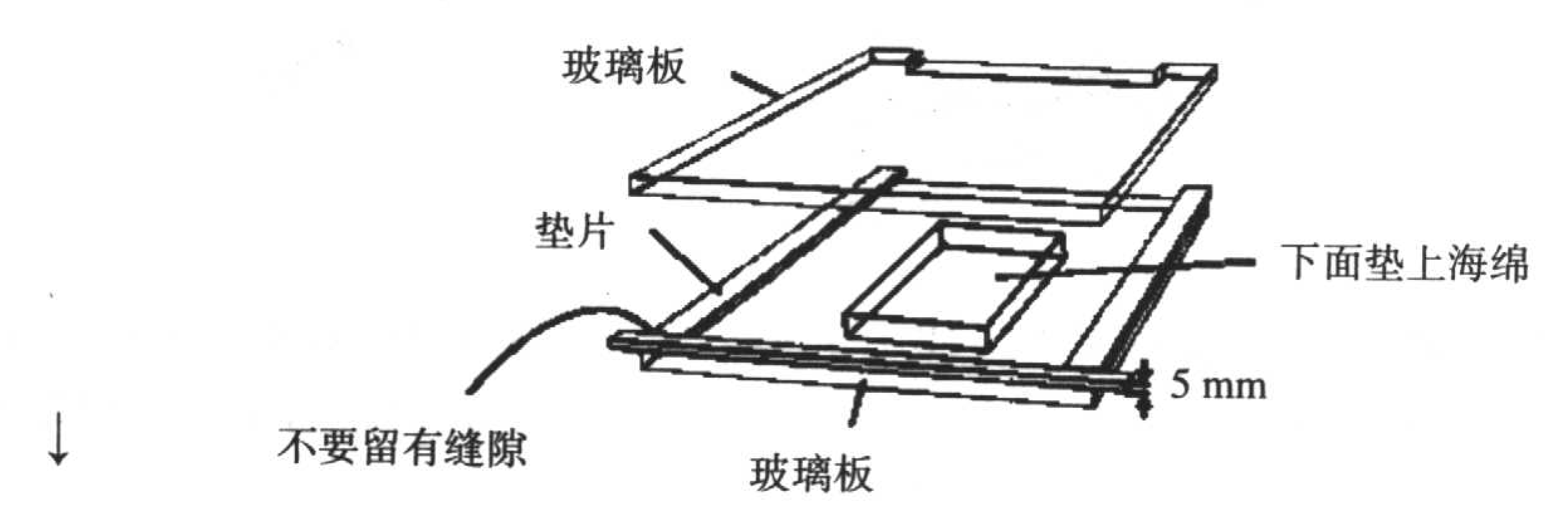
↓

ⓑ 用硅化液擦拭玻璃板。

↓

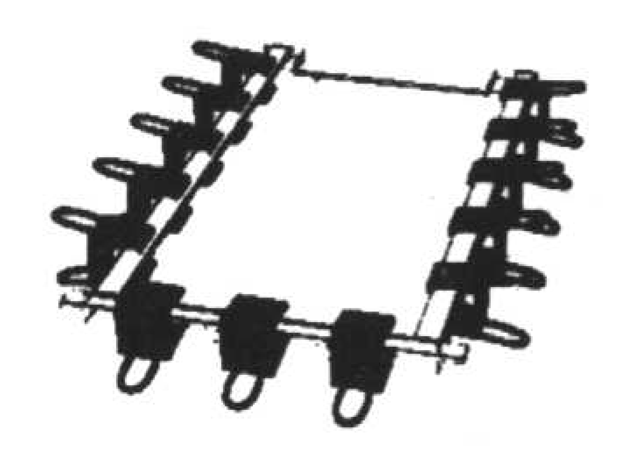
ⓒ 玻璃板边缘垫上垫片后，放上另一玻璃板[l]。

l. 上、下、左、右不要出现缝隙，以防凝胶渗漏。



↓

ⓓ 用夹子夹住玻璃板。



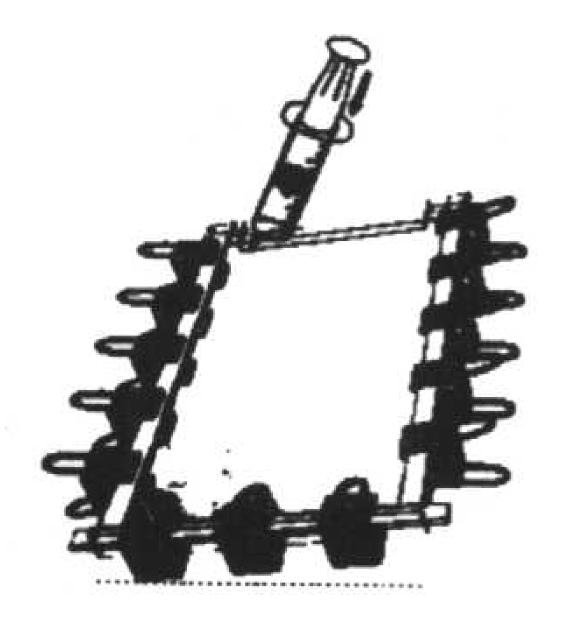
↓

ⓔ 在烧杯中加入 50 mL 5%丙烯酰胺/8 mol/L 尿素凝胶后，加 250 μL 10% APS 和 25 μL TEMED。

↓

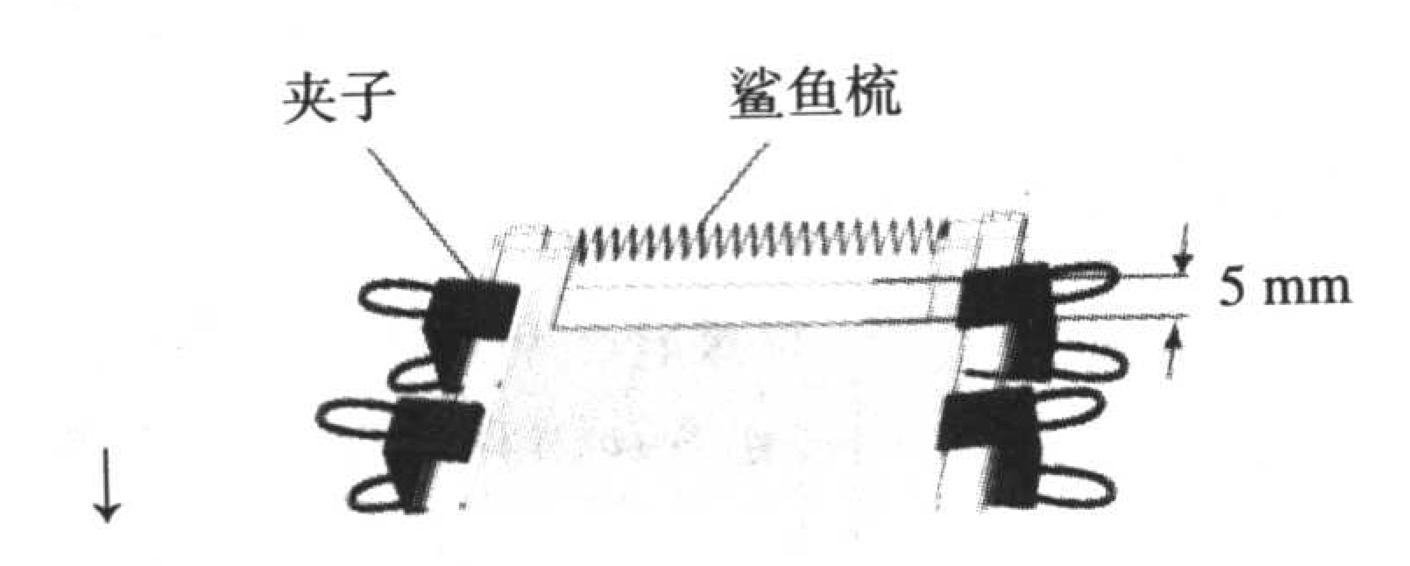
ⓕ 快速地用注射器将凝胶液注入玻璃板中，注意不要产生气泡[m]。

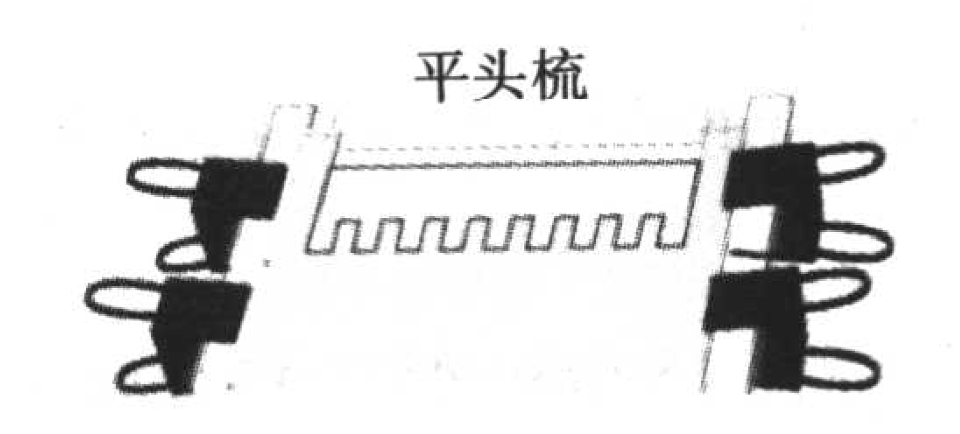
m. 熟练后可直接倒入凝胶液。倒入时右手斜持玻璃板，从右下或左下倒入凝胶。这样操作倒入凝胶的速度比较一致，不会产生气泡。



↓

ⓖ 在上部插入梳子。





↓

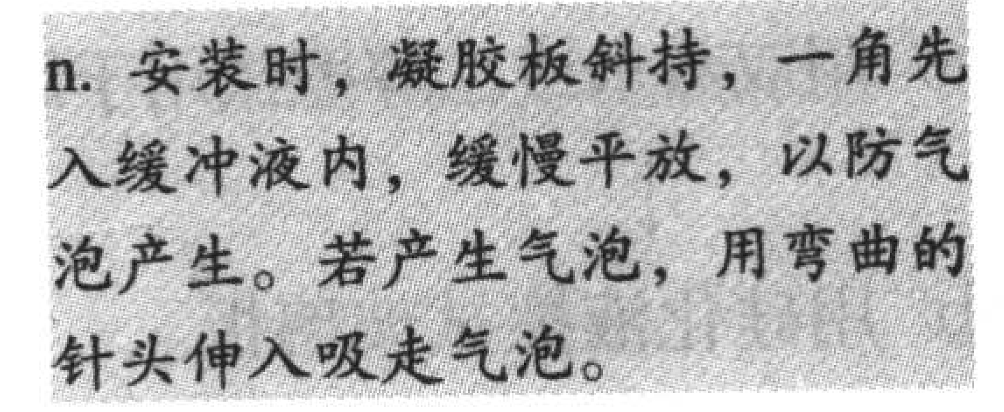
ⓗ 静置 1 h 以上使凝胶凝固。

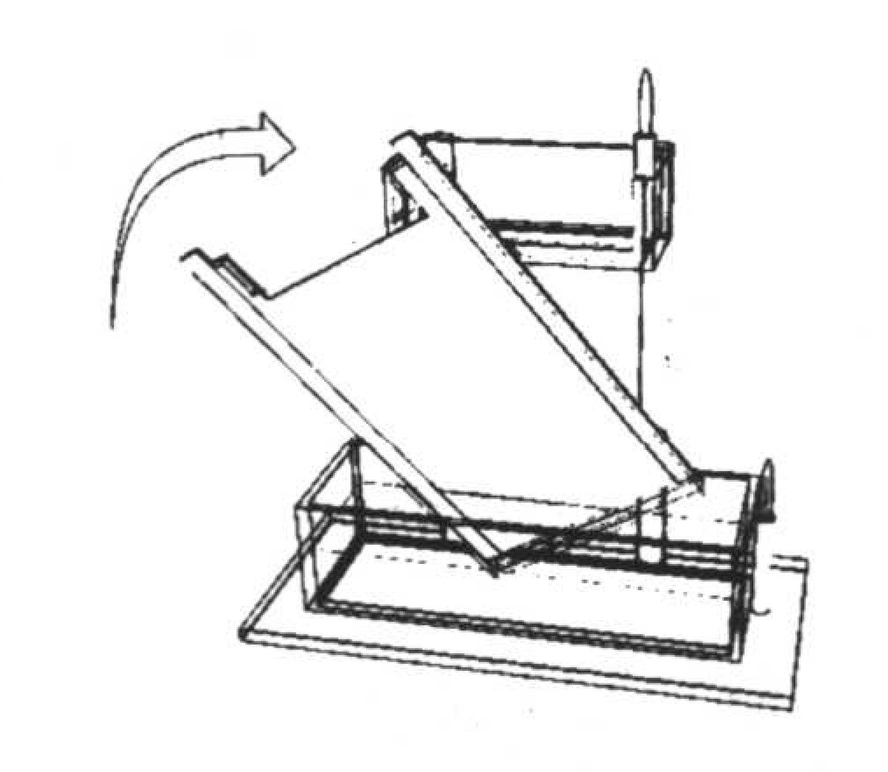
(3) 电泳(3 h 以上)

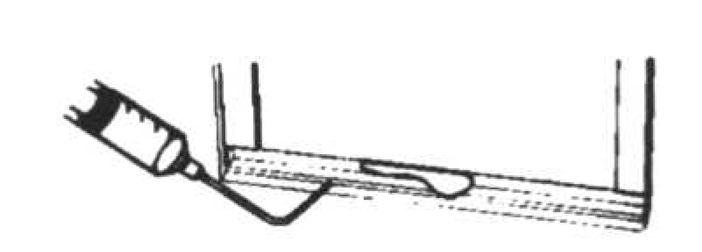
ⓐ 安装电泳槽装置，下槽中加 1×TBE 缓冲液。

↓

ⓑ 摘下凝胶板的梳子、夹子等，然后安装到电泳槽内[n]。


n. 安装时，凝胶板斜持，一角先入缓冲液内，缓慢平放，以防气泡产生。若产生气泡，用弯曲的针头伸入吸走气泡。

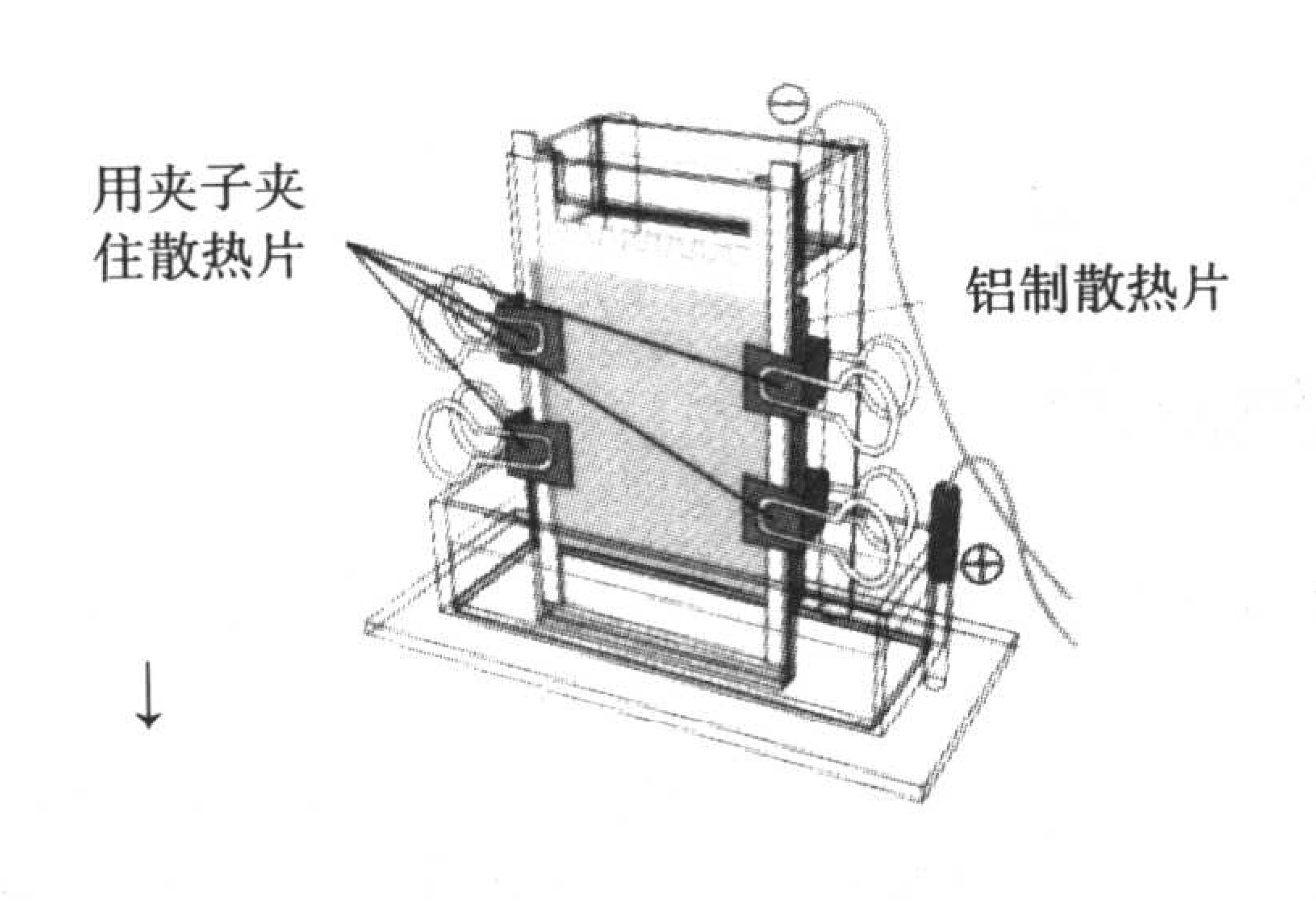


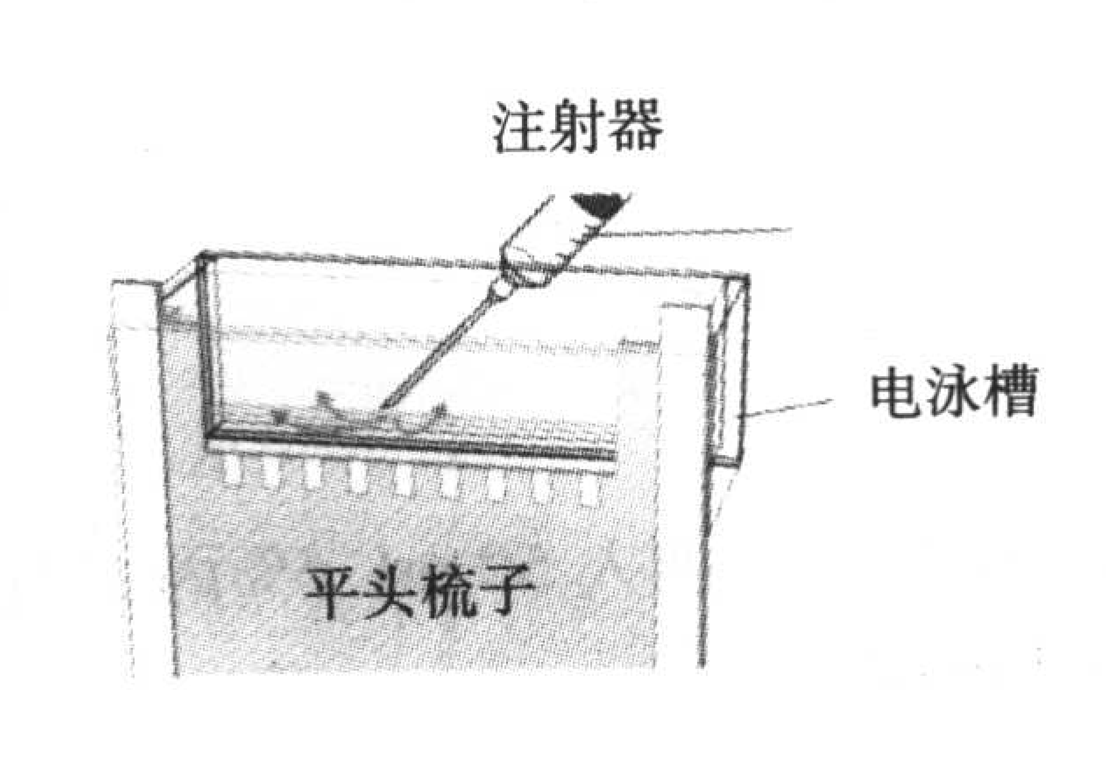


↓

ⓒ 在上槽中加 1×TBE，并安装垫片[o]。若为平头梳还应使用注射器吸走未聚合的凝胶。

o. 若没有散热片，由于温度过高，电泳图谱可能不理想或玻璃易碎裂。





↓

ⓓ 恒压(1000~1500 V)预电泳 15~30 min。

↓

ⓔ 样品中加点样缓冲液，95℃处理 3 min 以使样品变性。

↓

ⓕ 轻甩，立即置于冰中。

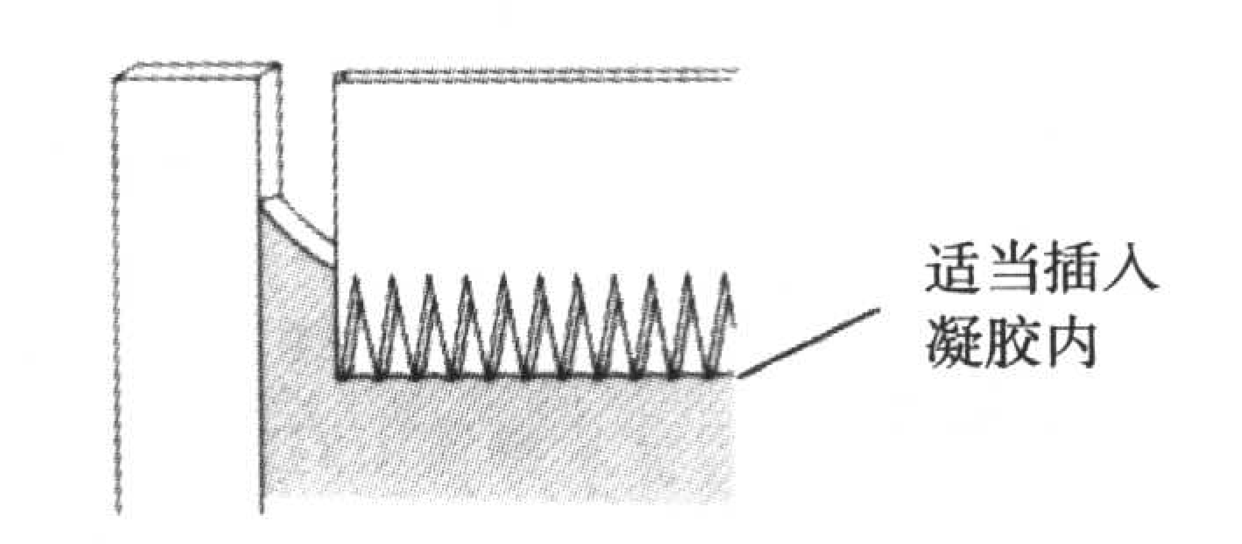
↓

ⓖ 停止预电泳，用注射器冲走可能析出的尿素[p]。

p. 因凝胶中尿素浓度很高，扩散到电泳缓冲液的尿素将被析出。

↓

ⓗ 将鲨鱼梳插入凝胶上部(此步仅适用于鲨鱼梳)。



↓

ⓘ 将ⓕ的样品上样[q,r]。

q. 在一侧点相对分子质量标准物。不用精确定量相对分子质量时，可用 ^{32}P 标记的 pBR322/ *Msp* I。

r. 对照为不加 RNase 消化的样品 RNA 及不加样品 RNA 的空对照。

↓

ⓙ 1000~1500 V 恒压下电泳 1 h 以上。

↓

ⓚ 当指示剂泳动到适当位置时停止电泳。溴酚蓝指示位置相当于 20~30 bp，二甲苯青指示位置相当于 100 bp 的泳动距离。

↓

ⓛ 从电泳槽中取下凝胶板，注意不要洒落缓冲液[s]。

s. 下槽缓冲液中含有 RNase 降解的短小探针，是同位素废弃物，应谨慎处理。

↓

ⓜ 用扁平金属药匙伸进玻璃板缝隙，小心地将两玻璃板分开。

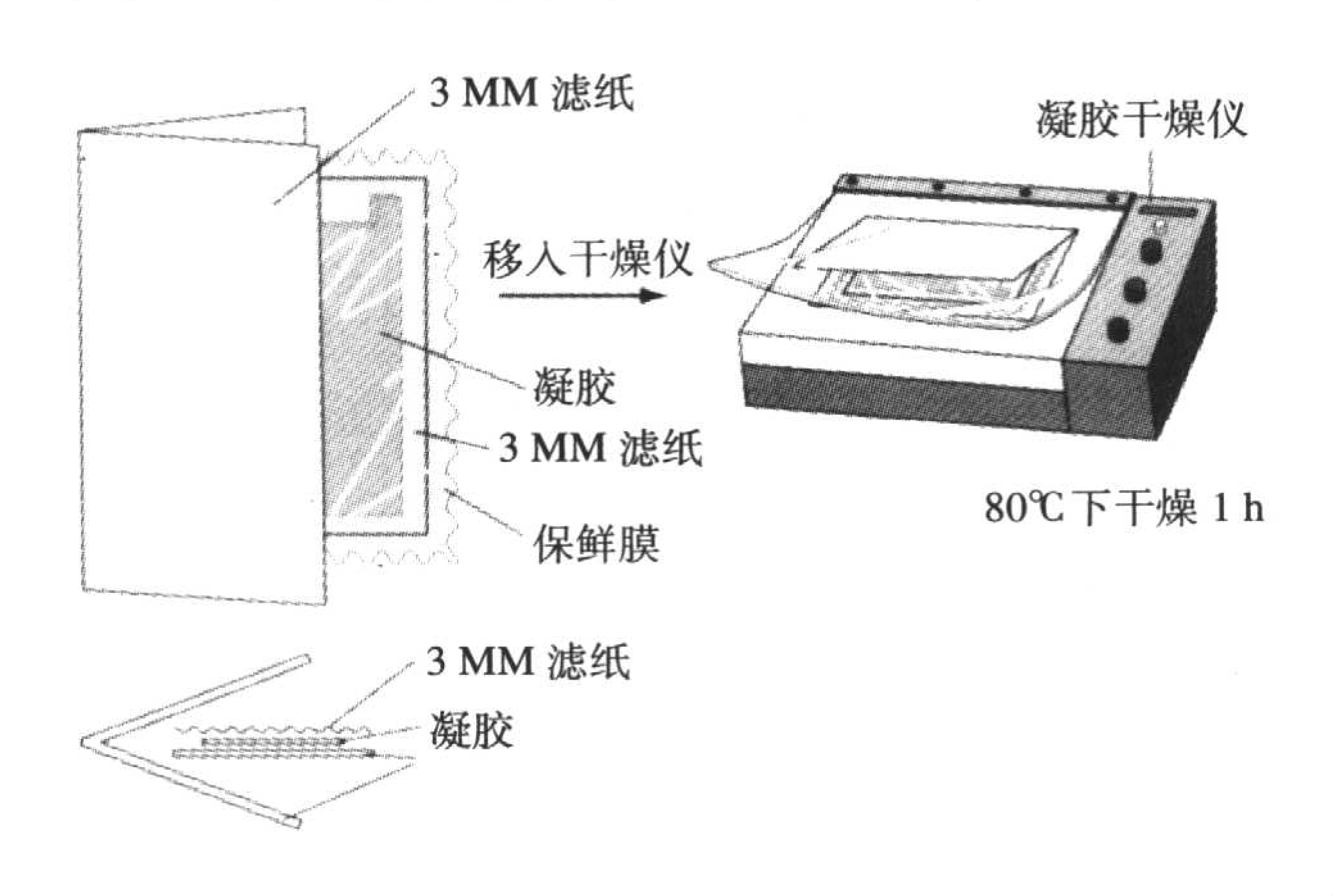
↓

ⓝ 拿走左右两侧的垫片，铺于与凝胶大小合适的 3 MM 滤纸上，然后小心地将胶与玻璃板分开，使胶铺在滤纸上。

↓

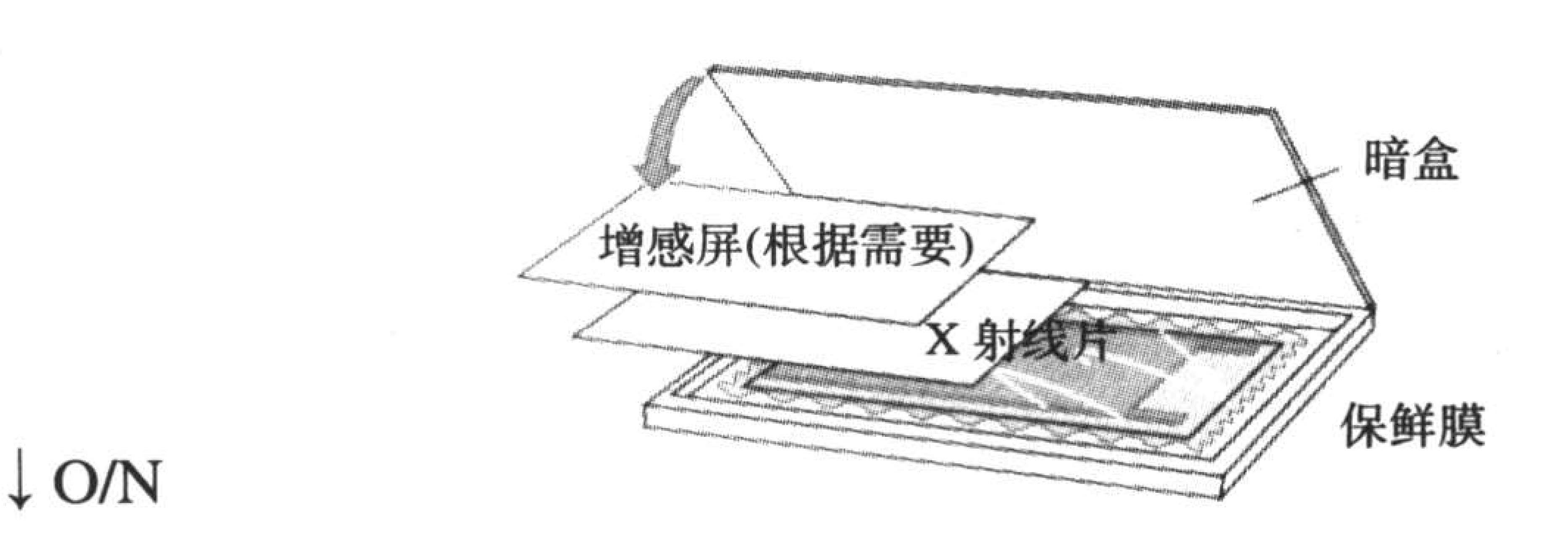
ⓞ 在凝胶上铺上保鲜膜，再用滤纸全部包裹起来。在凝胶干燥仪上干燥凝胶[t]。

t. 若无凝胶干燥仪，可用保鲜膜包裹直接夹于暗盒内，−70℃曝光。但背景不很清晰。



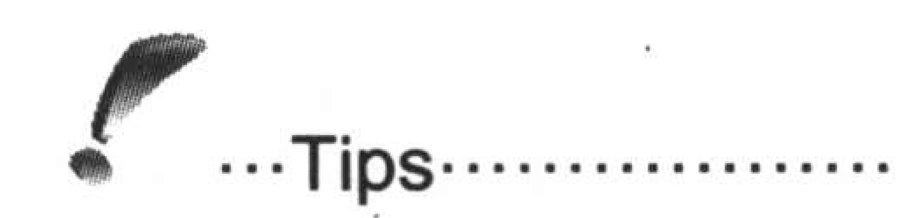
↓

ⓟ 干燥后的凝胶夹入暗盒内。暗室内夹上 X 射线片，−70℃过夜曝光。



↓ O/N

⑨ X 射线片成像，结果分析(图 24-3)。



…Tips………………

RNase 保护分析实验成功的关键是合适的RNase 稀释倍数及杂交温度。待测 RNA 不同，其对 RNase 的敏感性不同。因此应事先优化反应条件以保证实验成功。



…Questions………………

1. 简述基因转录分析方法的主要目的及原理。
2. Northern 印迹与 Southern 印迹的实验方案有何主要区别？Northern 印迹中尤其需要注意什么问题？
3. 如何提高 Northern 印迹的转膜效率和速度？
4. Northern 印迹中用到的 MOPS 缓冲液是否可用其他缓冲液替代？
5. 如何消除 Northern 印迹中的非特异背景？
6. 简述 RNase 保护分析的主要技术要点。如何分析所得的实验结果？

1 2 3 4

被保护的带

图 24-3　RNase 保护分析图谱

泳道 1，相对分子质量标准物；泳道 2，探针；泳道 3，不加样品的空对照；泳道 4，被保护的带

第四篇 表 达 篇

重组 DNA 表达技术是指在合适表达元件(如转录启动子、终止子、翻译调控序列、转录酶、翻译用核糖体、翻译因子等)调控下，目的基因高效表达成目的蛋白质的技术。基因表达有体外和体内两大系统。体内系统是借助生物细胞完成基因表达过程，又分为原核细胞表达系统和真核细胞表达系统。原核细胞系统主要有大肠杆菌表达系统和枯草杆菌表达系统等；真核表达系统主要有酵母表达系统、哺乳动物细胞表达系统、昆虫细胞表达系统和高等植物表达系统等。体外系统又叫无细胞蛋白质合成系统，包括 S30、小麦胚芽、网织红等，是在试管内模仿细胞内基因表达过程而实现目的基因表达。

第二十五章　无细胞蛋白质合成

第一节　概　　述

1. 什么是无细胞蛋白质合成系统?

大肠杆菌细胞表达体系的开发在蛋白质结构和功能的研究中发挥了重要的作用，但细胞自身发育的维持与工程蛋白质表达的矛盾有时很难协调一致，存在着各种制约因素影响着目的蛋白质的表达。为解决这一根本问题，开发出了无细胞蛋白质合成系统。

在试管内利用各种蛋白质合成必需因子(核糖体、延伸因子等)合成目的蛋白质的技术叫做无细胞蛋白质合成。进行无细胞蛋白质合成的反应系统叫做无细胞蛋白质合成系统。表 25-1 比较了各种无细胞蛋白质合成系统的主要特点。

表 25-1　各种无细胞蛋白质合成系统的比较

项目	大肠杆菌 S30	兔网织红	小麦胚芽
提取液制备	容易	难[a]	较易
模板	以 DNA 为主	以 RNA 为主[b]	以 RNA 为主[b]
表达量	高	低	中
最大分子质量[c]	120 kDa	200 kDa	240 kDa
修饰与加工	可能[d]	可能[d]	可能[d]
成本[e]	较低	高	高

注：a. 需从兔子身上采血；

b. 也有以 DNA 为模板的试剂盒销售；

c. 是目前报道的最大分子质量，不是指不能合成更大的蛋白质；

d. 可能需要微粒体膜；

e. 合成等量蛋白质需要的基本成本。

在无细胞蛋白质合成体系中，仅目的基因得以表达，因此，制约目的蛋白质表达的各种因素容易协调。此外，无细胞反应体系还可人为地改变，因而能有效地克服细胞表达体系的各种不足。

然而，无细胞蛋白质合成体系也存在着表达量不高的缺陷，但随着技术的改进，表达量正逐渐提高，目前可生产出用于蛋白质高级结构研究的毫克级量。随着功能基因组时代的到来，无细胞蛋白质合成系统的开发和应用受到了人们的更大关注。

2. 无细胞蛋白质合成体系

无细胞蛋白质合成反应体系主要由细胞提取液、蛋白质合成底物(ATP、GTP 及氨基酸)、缓冲液、盐类(如 Mg^{2+}等)及模板(DNA 或 RNA)等组成。这些物质混合于 Eppendorf 管中，在合适温度下保温，即可按照模板翻译出相应蛋白质。

细胞提取液主要来自原核生物的大肠杆菌或真核生物的兔网织红和小麦胚芽(表25-1)。这些提取液可从商家购买(如 Promega 公司)，也可自己制备。添加大肠杆菌提取液的反应体系可用 DNA 为模板，转录和翻译同时在一个 Eppendorf 管中进行。添加网织红或小麦胚芽提取液的反应体系一般只能用 mRNA 为模板，因此需事先将 DNA 转录成 mRNA，但最近也见到可用 DNA 为模板的试剂盒在销售。

无细胞蛋白质合成时间一般在 1h 左右，过长的反应时间，体系中的蛋白质反而减少。因此无细胞蛋白质体系的蛋白质表达量一般很低，这是无细胞蛋白质技术难以推广的主要瓶颈。究其原因，主要有以下几点：

(1) RNA 聚合酶转录活力低，导致 DNA 转录产生的 mRNA 量低；

(2) ATP 能量枯竭。由于 ATP 不能再生，体系中 ATP 的缺乏是翻译终止的主要原因；

(3) 反应条件不恰当；

(4) 体系中存在蛋白酶，对表达的目的蛋白质产生降解；

最近开展的许多课题主要围绕这些问题进行研究，以期提高表达量。

第二节　大肠杆菌无细胞蛋白质合成系统

1. 大肠杆菌 S30 提取液的制备 [a]

a. 务必遵照 RNase-free 操作要求。

Materials

(1) 高速冷冻离心机及离心管

(2) 37℃摇床

(3) 搅拌机

(4) 透析袋

用 500 mL 0.1 mol/L $NaHCO_3$ 与 10 mmol/L EDTA 的缓冲液煮沸，换液后再煮沸，然后存于装有双蒸水的烧杯中，高温高压灭菌，冷却至 4℃后备用

(5) 大肠杆菌高产培养基

A. 25% 葡萄糖	320 mL

高温高压灭菌 20 min

B. KH_2PO_4	22.4 g
K_2HPO_4	115.6 g
酵母提取物	4 g
消泡剂 LG-109	0.4 g

溶解于蒸馏水中，定容至 3.5 L。高温高压灭菌 40 min

C. 0.1 mol/L $Mg(Ac)_2$	40 mL

高温高压灭菌 20 min

D. 25% 酸水解酪素	160 mL

高温高压灭菌 20 min

E. 50 mg/mL 甲硫氨酸	4 mL

孔径 0.22 μm 滤膜过滤灭菌

F. 1 mg/mL 维生素 B_1	6 mL

孔径 0.22 μm 滤膜过滤灭菌

用前将组分 A~F 在无菌条件下混合，即成高产培养基。

(6) S30 缓冲液

6 mol/L KAc	20 mL
2.2 mol/L Tris · 乙酸(pH7.4)(附录一)	9 mL
1.4 mol/L $Mg(Ac)_2$	20 mL
0.1 mol/L DTT(附录一)	20 mL
β-巯基乙醇	1 mL
无菌水	1930 mL

DTT 和 *β*-巯基乙醇在用前加入，其他试剂配制后 4℃保存

(7) 预培养缓冲液

10 mg/mL 肌氨酸激酶(Roche)	0.375 mL
2.2 mol/L Tris · 乙酸(pH7.4)	2.1 mL
0.2 mol/L $Mg(Ac)_2$	0.7 mL
200 mmol/L ATP(用 KOH 调 pH7.0)	1 mL
100 mmol/L GTP(用 KOH 调 pH7.0)	0.27 mL
1.25 mol/L 肌氨酸磷酸钠(Roche)	1 mL
0.55 mol/L DTT(附录一)	0.12 mL
50 mmol/L 20 种氨基酸混合物	25 μL
无菌水	9.41 mL

(8) *E. coli* A19 (RNase I 缺陷株)

Protocols　　　　　　　Time: 3 d

(1) 预培养

ⓐ 预设摇床温度至 37℃。

↓

ⓑ 从甘油冻存管中接菌至 2 mL LB 培养基。

↓

ⓒ 培养 16 h。

(2) 培养

ⓐ 设置培养条件。温度：37℃，转速：300 r/min，通气：3 L/min。

↓

ⓑ 取 100 μL 预培养菌至 4 L 大肠杆菌高产培养基中。

↓

ⓒ 每隔 1 h，测定菌体浓度。若菌体 10 倍稀释液 $A_{450}=0.7$，则停止培养(约 5~7 h)，回



收菌体。

(3) 菌体回收、漂洗

ⓐ 菌液置于冰水中，转入离心管，平衡。

↓

ⓑ 4℃、8000 r/min 离心 10 min。

↓

ⓒ 沉淀悬浮于 S30 缓冲液中，并合管，S30 缓冲液总体积约为 400 mL。

↓

ⓓ 4℃、7500 r/min 离心 10 min。

↓

ⓔ 沉淀悬浮于 S30 缓冲液中。

↓

ⓕ 4℃、7500 r/min 离心 10 min。

↓

ⓖ 沉淀悬浮于 S30 缓冲液中。

↓

ⓗ 4℃、7500 r/min 离心 15 min。

↓

ⓘ 沉淀称重(约为 20~22 g)，保存于−70℃。

(4) S30 提取液制备

ⓐ 保存于−70℃的沉淀移至室温。

↓

ⓑ 加等重量 S30 缓冲液(不含 β-巯基乙醇)及 2 倍重量的玻璃珠($\Phi = 0.17$ mm)。

↓

ⓒ 用搅拌机破碎菌体。

↓

ⓓ 17 000 r/min (相当于 30 000 g)离心 30 min。

↓

ⓔ 小心地将上清转移至新管中。

↓

ⓕ 重复ⓓ的离心。

↓

ⓖ 小心地将 3/5 上清转移至新管中。

↓

ⓗ 按每毫升加 0.3 mL 预培养缓冲液，遮光下 37℃振荡 80 min。

↓

ⓘ 用 50 倍量 S30 缓冲液(不含 β-巯基乙醇)低温(4℃)透析，每 30 min 换 1 次透析袋，共换 6 次。

↓

ⓙ 透析物转移至新离心管中，4℃、7500 r/min 离心 10 min。

↓

ⓚ 取上清，分装成 200 μL/管，保存于液氮中，备用。

2. *CAT* 基因的转录与翻译

氯霉素乙酰基转移酶(chloramphenicol acetyltransferase, CAT)为 24.5 kDa 亚基组成的四聚体，其基因是一报道基因，也是大肠杆菌无细胞蛋白质合成系统的模式表达基因。

Materials

(1) 37℃恒温水浴锅

(2) 200 mmol/L ATP · Na_2(Amersham Pharmacia Biotech)[a]

(3) CGU 混合液[a]

100 mmol/L CTP · Na_2(Sigma)

100 mmol/L GTP · Na_3(Amersham Pharmacia Biotech)

100 mmol/L UTP · Na_3(Sigma)

(4) 50 mmol/L 或 156 mmol/L 20 种 L 型氨基酸混合液[a]

(5) 2 mmol/L DTT[a]

(6) LM 缓冲液

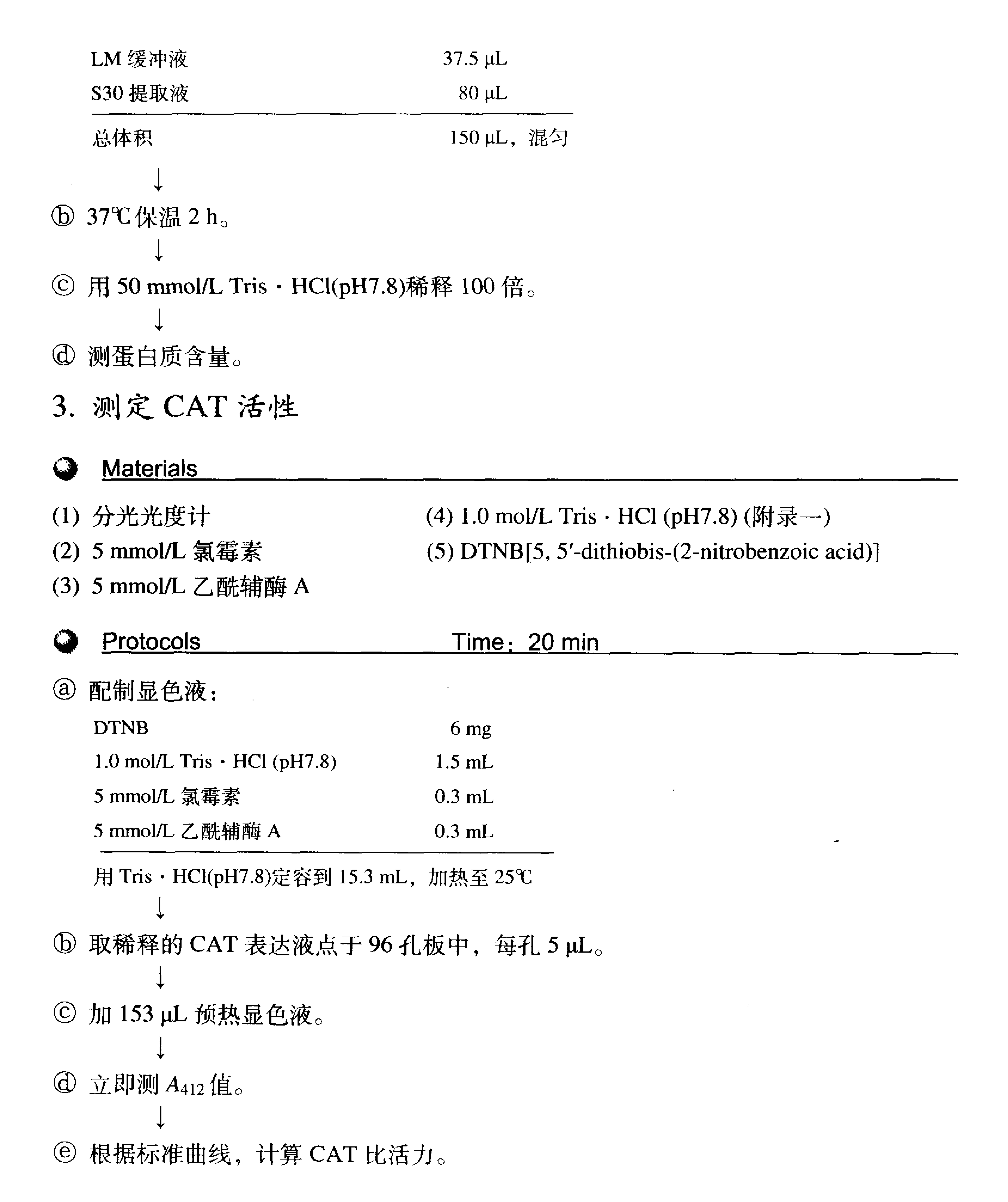
2.2 mol/L Tris · 乙酸(pH7.4)	40 μL
0.55 mol/L DTT	5 μL
200 mmol/L ATP	9.5 μL
CGU 混合液	13.26 μL
1.25 mol/L 肌氨酸磷酸钠(Roche)	62.4 μL
氨基酸混合液	15.6 μL
43.6% PEG 8000(Sigma)	143 μL
10 mg/mL 叶酸	5.4 μL
17.4 mg/mL *E.coli* tRNA(Roche)	15 μL
1.4 mol/L NH_4Ac	40 μL
无菌水	40.84 μL

a. 配制后用 2 mol/L KOH 调 pH 至 7.4，再分装并保存于−20℃备用。

Protocols　　Time：3 h

ⓐ 在 Eppendorf 管中混合下列溶液：

5 mol/L KAc	3 μL
200 mmol/L $Mg(Ac)_2$	7.5~9 μL
0.10 mg/mL 利福平	15 μL
10 mg/mL 肌氨酸激酶(Roche)	2.3 μL
6.25 U/μL 无机焦磷酸酶(Sigma)	5 μL
2.3 mg/mL T7 RNA 聚合酶	0.7 μL
9.85 mg/mL pK7-CAT	0.7 μL



LM 缓冲液	37.5 μL
S30 提取液	80 μL
总体积	150 μL，混匀

↓

ⓑ 37℃保温 2 h。

↓

ⓒ 用 50 mmol/L Tris · HCl(pH7.8)稀释 100 倍。

↓

ⓓ 测蛋白质含量。

3. 测定 CAT 活性

Materials

(1) 分光光度计
(2) 5 mmol/L 氯霉素
(3) 5 mmol/L 乙酰辅酶 A
(4) 1.0 mol/L Tris · HCl (pH7.8) (附录一)
(5) DTNB[5, 5′-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)]

Protocols　　Time：20 min

ⓐ 配制显色液：

DTNB	6 mg
1.0 mol/L Tris · HCl (pH7.8)	1.5 mL
5 mmol/L 氯霉素	0.3 mL
5 mmol/L 乙酰辅酶 A	0.3 mL

用 Tris · HCl(pH7.8)定容到 15.3 mL，加热至 25℃

↓

ⓑ 取稀释的 CAT 表达液点于 96 孔板中，每孔 5 μL。

↓

ⓒ 加 153 μL 预热显色液。

↓

ⓓ 立即测 A_{412} 值。

↓

ⓔ 根据标准曲线，计算 CAT 比活力。

第三节　小麦胚芽无细胞蛋白质合成系统

利用小麦胚芽无细胞蛋白质合成系统进行体外翻译，是以外源 mRNA 为模板，以 20 种氨基酸为原料(其中一种用放射性同位素标记进行翻译产物检测)，靠 ATP、GTP、肌氨酸磷酸盐和肌氨酸激酶提供能量，在 pH7.4 和适当 K^+、Mg^{2+}浓度下合成蛋白质。

小麦胚芽提取液广泛用于真核生物 mRNA 和病毒的体外翻译。其蛋白质产率虽比网织红细胞裂解物系统低，但其内源性 mRNA 水平低，翻译产物易鉴定，无需用钙激活的 RNA 酶处理，翻译产物不进行翻译后加工(只有向翻译系统中加入微粒体膜后才进行)，可根据 mRNA 分子大小选用不同浓度的离子。麦胚提取液价格低廉，制备简单易行。

1. 小麦胚芽提取液的制备 [a, b]

Materials

(1) 研钵

(2) 离心机及离心管

(3) 层析管(2 cm×30 cm)

(4) 纤维塞

(5) 分光光度计

(6) 双蒸水(2 L)：高温高压灭菌 120 min

(7) 2 mol/L KAc(1 L) [c]

(8) 1 mol/L $Mg(Ac)_2$(100 mL) [c]

(9) 0.5 mol/L $CaCl_2$(100 mL) [c]

(10) 1 mol/L HEPES · KOH(当稀释到 20 mmol/L 后，其 pH 为 7.6)(0.5~1 L) [d]

(11) 提取缓冲液(不含 DTT) (100~200 mL) [d]

20 mmol/L	HEPES · KOH(pH 7.6)
100 mmol/L	KAc
5 mmol/L	$Mg(Ac)_2$
2 mmol/L	$CaCl_2$

(12) Sephadex G25(优级纯)

取适量 Sephadex G25 至 1 L 三角瓶中(刚覆盖瓶底)，加双蒸水，室温下静置 1 h 使之充分膨胀。然后小心弃去上清。如此重复操作一次，以彻底弃去浮游颗粒。改用 0.1 mol/L KCl 溶液悬浮 Sephadex G25，室温下静置 1 h，弃去上清后，Sephadex G25 悬浮于 0.1 mol/L KCl 溶液中进行高温高压灭菌(20 min)，然后保存于室温，备用

(13) 平衡缓冲液

20 mmol/L HEPES · KOH(pH 7.6)

120 mmol/L KAc

5 mmol/L $Mg(Ac)_2$

1 mmol/L DTT(附录一，用前加入)

a. 必须遵照 RNase-free 操作要求。

b. 小麦胚芽提取液非常容易失活，因此操作应尽可能快。小麦胚芽应保存在于低温条件下，这是制备高活性小麦胚芽提取液的关键。与大肠杆菌提取液不同的是，小麦胚芽提取液对氧化非常敏感，因此溶液中一定要添加 DTT 以防氧化。

c. 用灭菌水配制后，再高温高压灭菌 20 min，室温保存。

d. 用灭菌水配制，分装成 50 mL/管，保存于−20℃。

Protocols　　Time：3 d

(1) 准备 Sephadex G25 柱

ⓐ 在层析管下端塞上适量的纤维塞，垂直于架子上。

↓

ⓑ 加满灭菌水，打开开关，使水流出。检查纤维塞中是否有气泡。若有，用长玻璃棒赶走。

↓

ⓒ 待液面降至仅存 2~3 cm 时，关闭阀门。

↓

ⓓ 按 Sephadex G25∶上清 = 1∶1 的比例保留上清，搅匀 Sephadex G25 后，立即填充到层析管中。注意不要产生气泡。

↓

ⓔ 打开阀门，让溶液流出。再填充 Sephadex G25 溶液，直至 Sephadex G25 高度在 30 cm 为止。

↓

ⓕ 转移至低温室，预冷。

(2) 平衡 Sephadex G25 柱

ⓐ 将平衡缓冲液(不含 DTT)充分预冷。

↓

ⓑ 在预冷的层析柱下放一废液缸，上接装有平衡缓冲液的试剂瓶。

↓

ⓒ 打开阀门，调节流量为 1 mL/min。

↓

ⓓ 800 mL 平衡缓冲液(不含 DTT)过夜平衡。

↓

ⓔ 再用 400 mL 平衡缓冲液(含 DTT)平衡，待液面恰与 Sephadex G25 面平齐时，关闭阀门。

(3) 小麦胚芽提取液的制备

ⓐ 取 4 g 小麦胚芽至预冷研钵中。

↓

ⓑ 加液氮研磨小麦胚芽成粉末。

↓

ⓒ 加 8 mL 提取缓冲液，混匀小麦胚芽粉末，浑浊液转移到离心管。

↓

ⓓ 离心(4℃、15 000 r/min、5 min)。

↓

ⓔ 离心管转移到低温室，取上清过滤。注意尽量弃去表面浮油。

↓

ⓕ 滤液加到层析管顶部。注意不要破坏 Sephadex G25 液面。

↓

ⓖ 打开阀门，控制流速为 2 mL/min。

↓

ⓗ 待褐色高分子质量组分与黄色低分子质量组分分开时，开始分部收集组分，每管为 3~4 mL。

↓

ⓘ 取各组分 10 μL，稀释 100 倍，测 A_{260} 值。

↓

ⓙ 将 A_{260} 值高的组分(0.9 以上)合并，转移至离心管中。

↓

ⓚ 离心(4℃、15 000 r/min、5 min)。

↓

ⓛ 上清转移至新管。

↓

ⓜ 分装成 100~200 μL/管，保存在−70℃冰箱中。

2. *GSTZ* 基因的转录

Materials

(1) 小型冷冻离心机

(2) 37℃恒温水浴锅

(3) 质粒 pMID I-AtGSTZ(0.5 μg/μL)：用 *Hin*d III 线性化(RNase-free 操作)

(4) MEGA转录试剂盒(T7/T3/SP6)(Ambion 公司)

(5) 100% 预冷乙醇

(6) 80% 预冷乙醇

Protocols　　Time：2 d

ⓐ

10×缓冲液	2 μL
10×ATP	2 μL
10×GTP	2 μL
10×CTP	2 μL
10×UTP	2 μL
线性 DNA	2 μL
10×酶混合液	2 μL
双蒸水	6 μL

混合均匀

↓

ⓑ 37℃保温 4 h。

↓

ⓒ 添加 1~2 μL DNase I，37℃保温 30 min。

↓

ⓓ 电泳检测模板 DNA 是否消化彻底。

↓

ⓔ 补充 30 μL 双蒸水，再添加 25 μL LiCl，混匀，−20℃下过夜。

↓

ⓕ 离心(4℃、15 000 r/min、15 min)。

↓

ⓖ 用 80%乙醇漂洗沉淀。

↓

ⓗ 干燥，溶解于双蒸水中，调整 mRNA 浓度至 0.5 μg/μL。

↓

ⓘ 分装成 10 μL/管，保存于−70℃。

3. GSTZ 的合成

Materials

(1) 27℃恒温水浴锅

(2) 5×合成混合液

300 mmol/L HEPES · TMA(pH 7.6)

5 mmol/L ATP · Na_2(用 KOH 调 pH7.0)

1 mmol/L GTP · Na_3(用 KOH 调 pH7.0)

1 mmol/L 亚精胺

100 mmol/L 肌氨酸磷酸钾

必要时，需要用 KOH 调节其 1×溶液的 pH 至 7.6。分装成 200 μL/管，保存于−70℃

(3) 氨基酸混合液

20 种 *L*-氨基酸，每种浓度为 1.28 mmol/L，保存于−70℃

1 mmol/L DTT(附录一)

(4) 小麦胚芽提取液

(5) mRNA(0.5 μg/μL)

(6) 肌氨酸激酶溶液

20 mmol/L HEPES-KOH (pH 7.6)

120 mmol/L KAc

5.0 mmol/L $Mg(Ac)_2$

20 mg/mL 肌氨酸激酶

配制后分装成 10 μL/管，保存于−70℃，不可反复冻融

Protocols　　　　Time：5 h

ⓐ

5×合成混合液	20.0 μL
$Mg(Ac)_2$(4.0 mmol/L)	5.0 μL
氨基酸混合液	12.5 μL
小麦胚芽提取液	20.0 μL
DTT(100 mmol/L)	4.0 μL
tRNA(10 mg/mL，Sigma)	5.0 μL
RNasin(Toyobo) (40 U/μL)	2.5 μL
肌氨酸激酶	2.5 μL
mRNA(0.5 μg/μL)	6.0 μL
双蒸水	22.5 μL

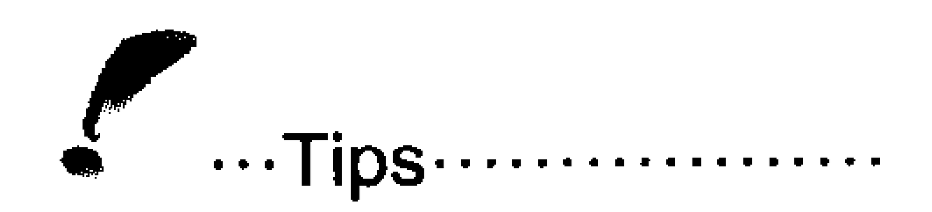
混匀

↓

ⓑ 27℃温育 2~3 h。

↓

© SDS-PAGE电泳检测(需要使用同位素)，测定GSTZ比活力(附录七)。



1. 蛋白质样品的浓缩

在蛋白质制备过程中常常由于过柱纯化而使样品变得很稀，为了保存和鉴定，需要对该稀样品进行浓缩。常用的浓缩方法有：

1) 减压加温蒸发

通过降低液面压力使液体沸点降低，减压的真空度越高，液体沸点降得越低，蒸发越快。此法适用于一些不耐热蛋白质和酶的浓缩。

2) 空气流动蒸发

空气的流动可使液体加速蒸发。在铺成薄层溶液的表面上不断通过空气流，或将蛋白质和酶液装入透析袋内置于低温室，用电扇吹风，溶剂不断蒸发而达到浓缩目的。此法浓缩速度慢，不适于大量溶液的浓缩。

3) 冰冻法

蛋白质和酶的盐溶液用此法浓缩时，不含蛋白质和酶的纯冰结晶浮于液面，蛋白质和酶则集中于下层溶液中，移去上层冰块，可得蛋白质和酶的浓缩液。

4) 吸收法

通过吸收剂直接吸走溶液分子而使之浓缩。所用吸收剂必须与溶液不起化学反应，常用的有聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和凝胶等。使用聚乙二醇时，先将蛋白质和酶液装入半透膜内，外加聚乙二醇，置于4℃下，袋内溶剂渗出即被聚乙二醇迅速吸去，聚乙二醇被水饱和后再更换新的，直至达到所需体积。

5) 超滤法

超滤法是一种使用特别薄膜对溶液中各种溶质分子进行选择性过滤的方法。当液体在一定压力下(氮气压或真空泵压)通过膜时，溶剂和小分子透过，大分子受阻保留。这是近年来发展起来的新方法，最适于生物大分子尤其是蛋白质和酶的浓缩或脱盐，并具有成本低、操作方便、条件温和、能较好地保持生物大分子活性、回收率高等优点。应用超滤法的关键在于膜的选择，不同类型和规格的膜、水流速度、相对分子质量截止值(即大体上能被膜保留的分子最小分子质量)等参数均不同，须根据需要来选用。另外，超滤装置形式、溶质成分及性质、溶液浓度等都对超滤效果有一定影响。

6) 纤维过滤透析法

用超滤膜制成空心纤维管，将很多根这样的管拢成一束，管的两端与低离子强度的缓冲液相连，使缓冲液不断地在管中流动。然后将纤维管浸入待透析的蛋白质溶液中。当缓冲液流过纤维管时，小分子很易透过膜而扩散，大分子则不能。由于透析面积增大，因而透析时间是一般超滤法的1/10。

2. 蛋白质样品干燥

真空干燥适用于不耐高温，易于氧化的蛋白质的干燥和保存。整个装置包括干燥器、冷凝器及真空泵三部分。干燥器内常放一些干燥剂，如P_2O_5、$CaCl_2$等。冷冻真空干燥除利用真空干燥原理外，同时增加了温度因素。在相同压力下，水蒸气气压随温度下降而下降，故在低温低压下，冰很易升华为气体。操作时一般先将待干燥的液体冷冻到冰点以下使之变成固体，然后在低温低压下将溶剂变成气体而除去。

3. 蛋白质样品保存

蛋白质和酶的稳定性与保存方法有很大关系。干燥制品一般比较稳定，在低温情况下其活性可在数日甚至数年内无明显变化，储藏简单，只需将干燥样品置于干燥器内(内装有干燥剂)密封，保存在0~4℃冰箱即可。

液态储藏也有其优点，首先是免去了繁杂的干燥过程，而且蛋白质和酶的活性及结构破坏较少。液态储藏时应注意以下几点：

(1) 样品不能太稀，必须浓缩到一定浓度后才能分装储藏。样品太稀易使蛋白质和酶变性。

(2) 一般需加入防腐剂和稳定剂。常用的防腐剂有蔗糖、甘油等。酶也可加入底物和辅酶以提高其稳定性。此外，钙、锌、硼酸等溶液对某些酶也有保护作用。

(3) 储藏温度要低，应视不同物质而定。

4. 蛋白质含量的测定

考马斯亮蓝 G-250 染色法是 1976 年由 Bradford 建立的。考马斯亮蓝 G-250 在酸性溶液中为棕红色，当它与蛋白质通过疏水作用结合后，变为蓝色。最大光吸收从 465 nm 转移到 595 nm 处。在一定范围内，蛋白质含量与 A_{595} 值成正比。方法如下：

(1) 染色液

考马斯亮蓝 G-250	100 mg
95% 乙醇	50 mL
85% 磷酸	100 mL

加水定容至 1 L

↓

(2) 标准曲线的绘制：在试管中分别加入含 0、10、20、30、40、50、60 μg 标准蛋白质溶液(一般为牛血清白蛋白)，用水补足至 60 μL 后，加 3 mL 染色液，混匀后室温放置 15 min，在 595 nm 处比色。以蛋白质含量为横坐标，A_{595} 值为纵坐标作图。

↓

(3) 取未知浓度的样品 60 μL，同上测定 A_{595} 值，从标准曲线上查出其相应含量。所测定样品的蛋白质含量应在 0.01~1.0 mg/mL 范围内。

该方法反应快、操作简便、消耗样品量少。但不同蛋白质差异大、标准曲线线性较差、显色受时间与温度影响较大，因此标样和蛋白质样品液的测定应在同一条件下进行。考马斯亮蓝染色能力很强，特别要注意比色杯的清洗。高浓度 Tris、EDTA、尿素、甘油、蔗糖、丙酮、硫酸铵、去垢剂等对测定均有干扰。

?…Questions………………

1. 什么是无细胞蛋白质合成系统？目前使用的系统有哪种类型？
2. 使用无细胞蛋白质合成系统进行目的基因表达的关键点是什么？
3. 无细胞蛋白质合成系统与细胞表达系统相比，各有何优缺点？
4. 无细胞蛋白质合成系统的能量来源是什么？
5. 制备大肠杆菌 S30 提取液需要注意什么问题？
6. 在小麦胚芽无细胞蛋白质合成系统中，模板 DNA 为什么需要线性化？

第二十六章 大肠杆菌表达系统

人类对大肠杆菌的遗传背景十分了解，用大肠杆菌进行遗传操作的方法也越来越完善。由于大肠杆菌生长快、繁殖周期短，因此很容易实现规模化大量表达目的蛋白，而且有广泛的菌株和载体供选择，所以，大肠杆菌是目前用得最多、研究最为成熟的基因表达系统。当前已商品化的基因工程产品大多是通过大肠杆菌表达的(表26-1)，此方法具有成本低、产量高、易于操作等优点。

表 26-1 使用大肠杆菌生产工程蛋白的实例

目的蛋白(物种)	质粒	宿主	溶解性	产量	备注
ζ-晶体蛋白(豚鼠)	pET21a	BL21(DE3)	可溶	5 mg/L	同时表达 GroEL/ES
甲状腺刺激激素(人)	pQE-9	SG13009	可溶	2.5 mg/L	
GGT 酶 II 型(人)	pET21c	BL21(DE3)	可溶	236 mg/L	分泌表达
白介素 13(人)	pMAL-c2	BL21(DE3)	不溶	11 mg/L	
Fab 片段(人)	pTrc99A	FA113	可溶	0.8 mg/L	同时表达 Skp
强心肌原蛋白	pSBET	BL21(DE3)	可溶	1.5 mg/L	
肿瘤坏死因子	pLX10T3	K12pT7POL26	可溶	30 mg/L	
耐热脂肪酶(*B. stearothermophilus*)	pQE60	M15(pREP4)	可溶	2.1×10^5 U/L	
NS4A(C 型肝炎病毒)		BL21(DE3)pLysS	可溶	20 mg/L	
Shikimate 激酶(*Mycobacterium tuberculosis*)	pET23a(+)	BL21(DE3)	可溶	末测定	

第一节 表达载体结构

用于目的基因表达的载体，除了含有与基因克隆载体相同的元件(如松弛型复制子、多克隆位点、筛选标记等)外，还应含有表达载体所需要的其他元件，包括启动子、核糖体结合位点、转录起始信号、转录终止信号、翻译起始密码子及终止密码子等一系列调控序列。

1. 启动子

启动子是 DNA 链上一段能与 RNA 聚合酶结合并能起始 mRNA 合成的序列，它是基因表达不可缺少的重要调控序列。没有启动子，基因就不能转录。目前，使用的大肠杆菌表达载体的启动子主要有 *lac*、*tac*、*trp*、T7、T5、P_RP_L 等，这些启动子都是可调控的强启动子。

使用 *lac* 为启动子的载体，诱导物(乳糖或其类似物，如 IPTG)加入到培养基中即与阻遏蛋白结合，使基因开放，转录出 mRNA 链，进而翻译出相应的蛋白质。

P_RP_L 启动子是 λ 噬菌体 *CI* 基因的负调控元件。CI 阻遏蛋白对温度敏感，28~30℃条件下，CI 蛋白表达被抑制。当温度升至 42℃时，CI 被破坏，于是启动子封闭被解除，使 P_RP_L 启动子开始转录。

2. 核糖体结合位点(SD 序列)

在 mRNA 上距起始密码子 AUG 上游 3~10 bp 处，有一段 3~9 bp 组成的富含嘌呤核苷酸的序列，它恰好与 16S rRNA 的 3′ 端富含嘧啶核苷酸的序列互补，这是核糖体 RNA 识别和结合的地方，称为核糖体结合位点，又叫 SD 序列。如果没有 SD 序列，mRNA 就不能翻译。SD 序列与 AUG 之间的距离，也影响着 mRNA 翻译成蛋白质的效率，一般认为以 5~13bp 为宜。因此在表达载体中都含有相应的 SD 序列及适当长度的 SD-ATG 间隔。

3. 终止子

在基因或操纵子的 3′ 端，常有一段特定的核苷酸序列，具有终止转录的功能，该序列称为转录终止子，简称终止子。它可能通过增加 mRNA 的稳定性和降低细胞内核苷酸消耗而有助于表达终止。在表达载体内，终止子多放在多克隆位点的下游。

4. 常用表达载体

1) 非融合蛋白表达载体

这类载体表达的非融合蛋白与天然蛋白质在结构、功能以及免疫原性等方面基本一致，这有利于以后的研究和应用。但是，由于要表达的基因在克隆入载体时，其 SD 序列与 ATG 之间的距离等影响翻译的因素不一定安排得合理，所以可能得不到理想的表达。

A) pKK 223-3

pKK 223-3 是 Pharmacia 公司的非融合表达载体，使用 *lac* 强启动子，可用 IPTG 诱导表达。紧接启动子的下游依次为多克隆位点和终止子。

含有核糖体结合部位和 ATG 密码子的基因，插入多克隆位点中的任何酶切位点均可表达。如果插入基因的起始密码子距 *Eco*R I 位点小于 8 bp，也可利用质粒上核糖体结合位点进行表达。

B) pBV220

pBV220 含有 λ 噬菌体的 P_R 和 P_L 串联启动子，以及 rrnB 核糖体 RNA 转录终止子和 λ 噬菌体 cIts857 温控序列，通过提高培养温度，可诱导目的基因高水平表达。

2) 融合蛋白表达载体

这类载体的 SD-ATG 距离已固定，翻译起始信号组织合理。用这类载体表达的蛋白质常在 N 端或 C 端融合有一段细菌多肽或蛋白质，这有利于产物检测和纯化。

A) pGEX 系列

Pharmacia 公司产品。其 SD 序列下游为谷胱甘肽巯基转移酶基因，克隆的目的基因与该基因相连，其表达产物则为谷胱甘肽巯基转移酶和目的基因产物融合体。

pGEX 载体的优点：①由三种不同可读框的质粒组成系列载体，可根据情况选用，以保证读码正确；②可用 IPTG 诱导表达；③表达产物可用比色分析或免疫学分析检测；④厂家生产的谷胱甘肽-sepharose 柱，可供表达产物的亲和纯化；⑤谷胱甘肽巯基转移酶部分可用凝血酶或凝血因子 X 切除。

B) pRSET 系列

Invitrogen 公司产品。优点：①由三种不同可读框的质粒组成的系列载体，可保证读码正确；②在 SD 序列和起始密码子下游，依次为编码 6 个组氨酸的序列、抗体结合序列、肠激酶识别序列和多克隆位点。目的基因插入多克隆位点后，可用 IPTG 诱导其表达。表达的融合蛋白由于含有 6 个连续组氨酸，与二价金属离子有很强的结合能力，可用金属螯合色谱柱方便地进行纯化。融合蛋白上的抗体结合部位可供免疫学检测。肠激酶识别部位则是肠激酶切割位点，可切除目的蛋白末端的多余肽段。

C) pET 载体

Novagen 公司产品，目前共包括 36 种载体、15 种宿主菌及用于检测和纯化目的蛋白的其他相关产品，已成为大肠杆菌表达重组蛋白的常用系统。目的基因被克隆到 T7 噬菌体强转录和翻译信号的控制之下，并通过宿主细胞提供 T7 RNA 聚合酶诱导其表达，诱导表达的目的蛋白可占细胞总蛋白含量的 50%。优点：①基础表达控制严格；②强有力表达调控系统；③提供各种不同需要的融合标签和表达系统配置；④提供可溶性蛋白生产、二硫键形成、蛋白质外运及多肽生产等专用载体和宿主菌。

第二节　表达中的问题

1. 真核基因的表达

大肠杆菌缺乏真核细胞转录后加工系统，不能切除前 mRNA 中的内含子，不能形成成熟的真核 mRNA。大肠杆菌也缺乏真核细胞翻译后修饰系统(如糖基化等)。要获得符合要求的真核基因，可采用以下办法：

(1) 从真核细胞中分离 mRNA，逆转录成 cDNA，再进行表达；

(2) 体外 DNA 合成法，适用于相对分子质量较小的蛋白质或多肽基因的克隆和表达；

(3) PCR 扩增法，设计并合成已知基因 5′和 3′两端引物，经 PCR 扩增技术获得所需基因。

2. 提高表达水平

克隆进表达载体后的目的基因，有时不能获得理想的表达，对此可从以下几方面进行调整：

(1) 改用融合表达蛋白载体，以提高表达的稳定性和产量；

(2) 改用更强的启动子以提高 mRNA 产量，并在基因下游加入稳定 mRNA 的强终止子；

(3) 调整 SD-ATG 距离；

(4) 改用蛋白酶缺陷型宿主菌，或在宿主菌内表达蛋白酶抑制剂，以减少表达蛋白的降解；

(5) 改用分泌型表达模式，以减少反馈抑制或蛋白酶降解；

(6) 适时加入诱导物，以防过早大量表达目的基因而影响宿主细胞的繁殖；

(7) 根据密码子简并性，减少目的基因中稀有密码子的比例；

(8) 消除核糖体结合位点附近可能的二级结构，加大 A、T 含量，提高翻译效率。

3. 包含体

目的基因在大肠杆菌中高效表达时，表达产物常在细胞质内聚集，形成不溶性的包含体。包含体内大部分为目的蛋白，此外还含有 RNA 聚合酶、外膜蛋白、rRNA、开环质粒 DNA、脂质、肽聚糖、脂多糖等。

包含体形成的原因及过程尚不十分清楚。有人认为可能与表达蛋白的生成速率快、局部浓度高、无足够时间使新生肽链正确折叠有关。也有人认为与培养温度、pH、某种金属离子不足等细胞内环境因素有关。

包含体的形成，有利也有弊。有利的是可防止蛋白酶对蛋白质的降解，也有利于表达产物的分离；不利的是包含体中的表达蛋白不溶于水，不具有生物活性，必须用变性剂溶解包含体并对表达蛋白做适当的复性处理。

如要避免包含体的产生，可尝试改变发酵条件。例如，降低培养温度(在 20~ 30℃培养)、降低诱导物浓度、缩短诱导时间、在细胞达到较高密度后再进行短时间诱导、增加通气等。如果改变发酵条件仍不能达到目的，则可尝试采用分泌型载体。

第三节 表达实例与 SDS-PAGE 检测

Materials

(1) 2×TY 培养基(附录一)

(2) IPTG(附录一)

(3) 30%丙烯酰胺溶液(附录一)

(4) 4×分离胶缓冲液
- 1.5 mol/L Tris · HCl (pH8.8) (附录一)
- 0.4% SDS(附录一)

(5) 4×浓缩胶缓冲液
- 0.5 mol/L Tris · HCl (pH6.8) (附录一)
- 0.4% SDS(附录一)

(6) 50%(*V*/*V*)甘油

(7) 10% APS(过硫酸铵，新鲜配制)

(8) TEMED

(9) 浓缩胶混合物

30%丙烯酰胺溶液	15 mL
4×浓缩胶缓冲液	25 mL
双蒸水	60 mL

(10) 10×电极缓冲液

Tris	30.3 g
甘氨酸	144 g
SDS	10 g

用双蒸水定容到 1000 mL

(11) 2×样品缓冲液

4×浓缩胶缓冲液	25 mL
甘油	20 mL
SDS	4 g
溴酚蓝	数毫克

用双蒸水定容到 1000 mL

(12) 2×点样缓冲液：100 mL

2×样品缓冲液	9 体积
巯基乙醇	1 体积

(13) 固定液

甲醇	50%
乙酸	7.5%

(14) 染色液

CBB-R250	0.625 g
甲醇	25 mL
乙酸	12.5 mL
双蒸水	112.5 mL

(15) 脱色液

甲醇	7%
乙酸	10%

Protocols



(1) 基因的表达

ⓐ 在含有 Amp 的 10 mL 2×TY 培养基上 37℃培养重组菌至 A_{600}<0.8。

↓

ⓑ 加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L，继续 37℃培养过夜。

↓

ⓒ 1000 r/min 离心 10 min 以收集菌体。

↓

ⓓ 沉淀重悬于加有 0.3 mg/mL 溶菌酶、0.01% Triton X-100 的 100 mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.4)中，室温保温 30 min。

↓

ⓔ –70℃冰冻、4℃化冻。如此冻融 2 次。

↓

ⓕ 超声波处理，剪切 DNA、破坏菌体。

↓

ⓖ 15 000 r/min 离心 15 min，上清转入新管即为酶粗提液。必要时测定蛋白质含量。

(2) 12.5% SDS-PAGE 胶的准备

ⓐ 准备胶板，组装，水平放置。

↓

ⓑ 配制 12.5%分离胶。搅拌，注意勿产生气泡。若产生气泡应用玻璃棒排除：

30% 丙烯酰胺溶液	5 mL
4×分离胶缓冲液	3 mL
50%甘油	2.4 mL
双蒸水	1.5 mL
10% APS	120 μL
TEMED	12 μL

↓

ⓒ 加到胶板中。注意勿产生气泡。若产生气泡，则轻轻敲打玻璃板或用细长铁丝排除。

↓

ⓓ 加 1 mL 双蒸水，静置 30 min 以上直至凝胶凝固。

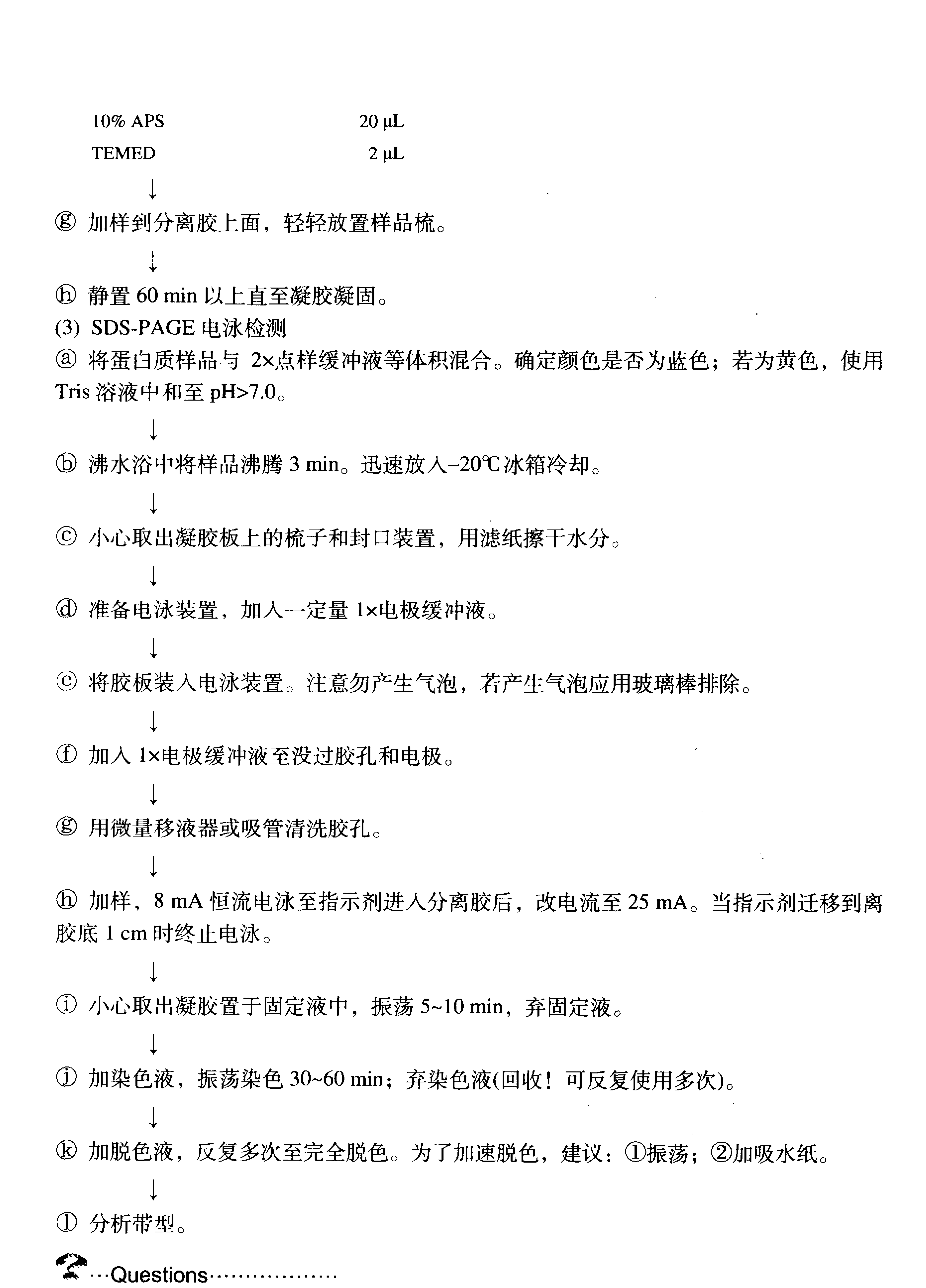
↓

ⓔ 弃水，用滤纸条伸进槽中完全吸干水分。注意不能破坏形成的界面。

↓

ⓕ 配制浓缩胶。搅拌，注意勿产生气泡。若产生气泡应用玻璃棒排除：

浓缩胶混合物	2 mL



10% APS	20 μL
TEMED	2 μL

↓

ⓖ 加样到分离胶上面，轻轻放置样品梳。

↓

ⓗ 静置 60 min 以上直至凝胶凝固。

(3) SDS-PAGE 电泳检测

ⓐ 将蛋白质样品与 2×点样缓冲液等体积混合。确定颜色是否为蓝色；若为黄色，使用 Tris 溶液中和至 pH>7.0。

↓

ⓑ 沸水浴中将样品沸腾 3 min。迅速放入–20℃冰箱冷却。

↓

ⓒ 小心取出凝胶板上的梳子和封口装置，用滤纸擦干水分。

↓

ⓓ 准备电泳装置，加入一定量 1×电极缓冲液。

↓

ⓔ 将胶板装入电泳装置。注意勿产生气泡，若产生气泡应用玻璃棒排除。

↓

ⓕ 加入 1×电极缓冲液至没过胶孔和电极。

↓

ⓖ 用微量移液器或吸管清洗胶孔。

↓

ⓗ 加样，8 mA 恒流电泳至指示剂进入分离胶后，改电流至 25 mA。当指示剂迁移到离胶底 1 cm 时终止电泳。

↓

ⓘ 小心取出凝胶置于固定液中，振荡 5~10 min，弃固定液。

↓

ⓙ 加染色液，振荡染色 30~60 min；弃染色液(回收！可反复使用多次)。

↓

ⓚ 加脱色液，反复多次至完全脱色。为了加速脱色，建议：①振荡；②加吸水纸。

↓

ⓛ 分析带型。

…Questions………………

1. 真核基因在大肠杆菌表达系统中进行表达可能出现哪些问题？如何解决？

2. 大肠杆菌表达载体的结构有何特点？你知道哪些原核表达载体及相应菌株，请举例说明。
3. 大肠杆菌表达系统所表达的目的蛋白产量一般处于什么水平？与其他系统相比有何优势？
4. 在解决包含体问题上，你有什么好的建议？
5. 如何分析大肠杆菌表达系统表达的目的酶的比活力？
6. 如何选择合适的载体和菌株用于你的研究中？根据你选择的载体请选择配套的表达方案。

第二十七章　枯草杆菌表达系统

第一节　菌株与载体

用枯草杆菌表达工程蛋白的早期问题是：细胞内的蛋白酶异常活跃，导致工程蛋白容易降解；表达的工程蛋白因不能正确折叠而缺少活性。随着蛋白酶缺陷株、分子伴侣表达株的构建，利用枯草杆菌表达工程蛋白的研究和应用也逐渐增多起来。

枯草杆菌表达系统中使用的质粒几乎都来自于葡萄球菌的高拷贝质粒 pUB110，及由此发展的 pHY300PLK。不使用大肠杆菌系统的 *lac* 启动子/操作子元件，而采用枯草杆菌 SPO1 噬菌体启动子与大肠杆菌 *β*-半乳糖苷酶操作子组成的调控元件，目的基因位于该调控元件下游，因此也可用 IPTG 诱导物来调控目的基因的表达。

第二节　转　　化

1. 原生质体转化法

Materials

(1) DM3 固体培养基

1 mol/L 丁二酸二钠(pH 7.3)	500 mL
5% 酸水解酪素	100 mL
10% 酵母提取物	50 mL
3.5% K_2HPO_4/1.5%KH_2PO_4	100 mL
50%葡萄糖	10 mL
4 mol/L $MgCl_2$(附录一)	5 mL
2% 牛血清白蛋白	5 mL(过滤灭菌)
琼脂	8 g
双蒸水	230 mL

各溶液分别灭菌，冷却至 55℃后混合

(2) SMMP 培养液

2×SMM 培养液与 4×Pen 培养液等量混合

(3) 40% PEG6000 溶液

取 40 g PEG6000 溶于 50 mL 2×SMMP 培养液后，用无菌水定容至 100 mL

(4) 10×Pen 培养液

3 号抗生素培养基(Difco 公司)　17.5 g

用水定容至 100 mL，过滤灭菌。使用时用无菌水稀释

(5) 5×SMM 培养液

2.5 mol/L 葡萄糖

0.1 mol/L 苹果酸

0.1 mol/L $MgCl_2$(附录一)

配制后过滤灭菌，用时用无菌水稀释

Protocols　　Time：2 d

ⓐ 30℃、LB 平板上过夜培养的枯草杆菌转接至 100 mL 1×Pen 液体培养基中。

↓

ⓑ 37℃振荡培养 2~3 h。6000 *g* 离心 10 min，收集菌体，彻底弃去上清。沉淀悬浮于 4.5 mL SMMP 培养液中。

↓

ⓒ 在 0.5 mL SMMP 培养液中添加 10 mg 溶菌酶后，补加到悬浮有沉淀的 SMMP 培养液中，37℃继续振荡培养。

↓

ⓓ 60 min 后取样在光学显微镜下镜检 80%以上的细胞是否已成为原生质体。

↓

ⓔ 2600 *g* 离心 15 min，收集原生质体，并重悬于 5 mL SMMP 培养液中。

↓

ⓕ 2600 *g* 再离心 15 min，收集的原生质体再重悬于 2~5 mL SMMP 培养液中。

↓

ⓖ 取 0.2 mL 原生质体液，添加 50 μL DNA 液与 50 μL 2×SMMP 液，混匀，立即加 1.5 mL 40% PEG6000 溶液，充分混匀。

↓

ⓗ 室温下静置 2 min 后，加 5 mL SMMP 溶液，迅速颠倒混匀。

↓

ⓘ 2600 *g* 离心 10 min，收集原生质体。原生质体重悬于 1 mL SMMP 液，30℃振荡培养 2~3 h。

↓

ⓙ 用 SMMP 液适当稀释后，37℃下培养于含 150 μg/mL 卡那霉素、0.3 μg/mL 红霉素及 12.5 μg/mL 氯霉素的 DM3 双层培养基上 2~3 天。

2. 电转化法

原生质体转化法操作比较复杂，重复性也较低，因此目前常用的方法是电转化法。广泛使用的转化枯草杆菌的电转化仪是 Bio-Rad 公司生产的，转化率非常高。

Protocols　　Time：1 h

ⓐ 枯草杆菌振荡培养在 250 mL LB 培养液中，待生长至对数期时转移至预冷的离心管中，并立即静置于冰中，10 min 后，4℃离心，沉淀用 100 mL 预冷转化液(10%甘油、0.5 mol/L 山梨酸、0.5 mol/L 甘露醇)漂洗 2 次。

↓

ⓑ 用预冷电转化液制作密度为 5×10^{10} 个/mL 的细胞悬浮液。分装至离心管，每管 45 μL，保存于−70℃，备用。

↓

ⓒ 使用时，冰上化冻，然后与 DNA 混匀，用电转化仪进行电转化。转化条件为 400 Ω、25 μF、25 kV。

↓

ⓓ 立即加 1 mL 含 10%甘油的 LB 培养液，1 min 后转至 1.5 mL Eppendorf 管中。培养 4 h 后，铺于选择培养基上。

第三节　蛋白质的提取

Materials

(1) TEA 缓冲液

50 mmol/L 三乙醇胺

5 mmol/L $Mg(Ac)_2$

0.5 mmol/L PMSF

1 mmol/L DTT(附录一)

(2) 液体 LB 培养基

(3) 液体 2×TY 培养基

Protocols　　Time：1 d

ⓐ 挑选菌株接种于 LB 培养液中，取 2 mL 过夜振荡培养物接种于 100 mL 2×TY 培养液中，37℃振荡培养 6 h。

↓

ⓑ 离心收集菌体，沉淀用 TEA 缓冲液悬浮，再离心，所得菌体转至研钵中，置于−20℃(或−70℃)冰箱中，使之结冰。

↓

ⓒ 加等量石英砂，剧烈研磨成糊状。

↓

ⓓ 加 TEA 缓冲液使之成悬浮液，冰上静置 30 min 以使菌裂解液与石英砂分层。

↓

ⓔ 上清转至预冷的新离心管中，加 5 U/mL RQ1 RNase-free DNase，4℃处理 2 h。

↓

ⓕ 7500 *g*，4℃超速离心 2 h，上清即为蛋白质(酶)提取物。

?…Questions………………

1. 枯草杆菌表达系统的载体与菌株有何特点？
2. 枯草杆菌表达系统适合哪类目的基因的表达？
3. 与大肠杆菌表达系统相比，枯草杆菌表达系统在操作上有何特别之处？
4. 有几种针对枯草杆菌表达系统的转化方法？其原理分别是什么？
5. 枯草杆菌表达系统所表达的目的蛋白在什么水平上？
6. 在枯草杆菌表达系统中目的蛋白的表达有何规律？

第二十八章　放线菌表达系统

第一节　菌株与载体

放线菌是有特殊菌丝结构的革兰氏阳性菌，基因组 DNA 中 G + C 含量高，因此基因的重组与蛋白质的表达存在一定困难。但通过选择合适的菌株与表达载体常常能获得很高的表达量。pSEV2 在灰包链霉菌(*Streptomyces griseus*)TK24 强启动子作用下，蛋白质表达量很高。培养基中添加 1 ng 的硫链丝菌素，具有硫链丝菌素启动子的 pAK114 能使目的基因转录活性提高 200 倍。

第二节　放线菌培养

Materials

(1) 温控振荡摇床

(2) Bennet-葡萄糖培养基

(3) 灰色链霉菌 TK24 启动子

Protocols　　Time：4 d

ⓐ 菌株接种到平板上，28℃培养至整个平板长满菌丝为止。切取含 1 cm 长菌丝的培养基，转接至 200 mL(用 500 mL 三角瓶)液体 Bennet-葡萄糖培养基中，28℃、130~135 r/min 振荡培养 48 h。

↓

ⓑ 取 20 mL 菌液转接至 1 L 液体 Bennet-葡萄糖培养基中(使用 5000 mL 三角瓶)，130~135 r/min 振荡培养 48 h。

第三节　转　　化

Materials

(1) P 缓冲液

① 蔗糖 36 g，K_2SO_4 0.0075 g，$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.61 g，微量元素溶液[$ZnCl_2$ 40 mg/mL，$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 200 mg/mL，$CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 10 mg/mL，$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 10 mg/mL、$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 10 mg/mL、$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 10 mg/mL] 0.6 mL，用双蒸水定容至 200 mL

② 0.5% KH_2PO_4 溶液 3 mL

③ 3.7% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 30 mL

④ 0.25 mol/L TES 缓冲液(pH7.2) 30 mL

①~④配制后分别灭菌，冷却至室温后混合

(2) 再生培养基

蔗糖 130 g，酸水解酪素 0.1 g，酵母提取物 5 g，微量元素溶液 2 mL，$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g，$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g，$CaCl_2$ 1 g。用双蒸水定容至 1000 mL。灭菌后添加 0.5% KH_2PO_4 4 mL，5 mol/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1.6 mL，20% 脯氨酸 6 mL，1 mol/L NaOH 2.8 mL

(3) PEG 溶液

1 g PEG1000 溶于 3.9 mL 的 P 缓冲液中

Protocols　　Time：3 h

ⓐ 低速离心放线菌液，收集菌体，菌体悬浮在少量 0.3 mol/L 的蔗糖溶液中。

↓

ⓑ 转接至含 5 mg/mL 溶菌酶的 P 缓冲液中，混匀。30℃，静置 1 h。

↓

ⓒ 缓冲液若浑浊，用 10 mL 玻璃吸管吸打数次。

↓

ⓓ 用纱布过滤除去菌丝体，原生质体悬浮在 P 缓冲液中，低速离心收集原生质体。

↓

ⓔ 将等量 DNA 溶液与原生质体混合，吸打混匀。

↓

ⓕ 加 2 mL PEG1000 溶液，室温下静置 2~3 min。

↓

ⓖ 加 8 mL P 缓冲液，低速离心收集原生质体。

↓

ⓗ 再悬浮于 P 缓冲液，再低速离心收集原生质体。原生质体均匀涂布于再生培养基上。

第四节　蛋白质的提取

Materials

(1) TE 溶液　　(2) 0.5 mol/L EDTA 溶液

Protocols　　Time：3 h

ⓐ 6000 *g* 离心 15 min 收集菌体，沉淀悬浮于 15 mL TE 中。

↓

ⓑ 6000 *g* 离心 15 min 收集菌体，沉淀悬浮于 10 mL TE 中。

↓

ⓒ 加 0.5 mol/L EDTA 100 μL 及 10 mg 溶菌酶，混匀。

↓

ⓓ 室温下旋涡高速振荡 30 min，添加 RNase 和 DNase 至终浓度分别为 10 μg/mL 和 50 μg/mL，室温下再旋涡振荡 30 min。

↓

ⓔ 4℃、75 000 *g* 超速离心 2 h，上清即为蛋白质提取物。

…Questions………………

1. 放线菌表达系统有何特点？在操作上有何特别之处？
2. 放线菌表达系统适合哪类基因的表达？
3. 放线菌系统的 DNA 转化中，为什么采用低速离心收集原生质体？
4. 在放线菌表达系统中，目的蛋白的表达量通常在什么水平？其表达规律是什么？
5. 在收集放线菌表达系统中的目的蛋白时，为什么使用核酸酶？
6. 常用的放线菌表达载体的结构有何特点？

第二十九章　酿酒酵母表达系统

大肠杆菌是原核生物，不具有真核生物基因表达的调控机制和蛋白质加工修饰能力，表达产物有时还以没有活性的包含体形式存在。因此，以酵母为宿主表达目的蛋白的研究日益引起重视。酵母是低等真核生物，除具有生长快、易培养、遗传操作简单等原核生物的优点外，还具有真核生物的蛋白质加工、修饰、合理折叠等功能，因此非常适合于真核基因的表达。酿酒酵母和毕赤酵母是常用的两大酵母表达系统。

第一节　酿酒酵母表达系统概述

1. 载体

利用酿酒酵母表达目的基因，选择合适的表达载体是非常重要的，包括哪种启动子、目的蛋白是否需要分泌、目的DNA整合到染色体上还是游离于染色体之外(存在于质粒)等。

(1) pYI(yeast integration plasmid，酵母整合质粒)型载体

这是一种整合型载体，如pYI5，不含酵母DNA复制起始区，不能在酵母中进行自主复制，含有整合介导区，可整合到酵母染色体上，在无选择压力下分裂时保持稳定，但拷贝数较少。

采取一些措施可以初步解决拷贝数较少的问题。第1个策略是用酵母转座子来产生多个插入拷贝；第2个策略是将重组DNA插入到核糖体DNA簇中，在宿主XII号染色体上以150拷贝的串联重复序列存在，如用特殊质粒(如pMIRY2)转化可产生上百个整合拷贝。

(2) pYE (yeast episomal plasmid，酵母附加质粒)型载体

这是一种附加型载体，如pYE13，含有酿酒酵母2μ质粒DNA复制有关的部分或全部序列，能独立于酵母染色体之外复制，为穿梭质粒(*E. coli*和*S. cerevisiae*)，常以30或更多拷贝存在，但不稳定。为了克服这些不稳定性，以脆弱的srbl-1突变宿主菌株为基础建立起了自然选择系统，该系统的突变菌株要求渗透压稳定，否则会裂解，转化后带野生型SRB的自主复制pYE型质粒与菌株互补，可在培养基上保持选择性。

2. 菌株

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)，又叫面包酵母，是单细胞真核微生物，在分子遗传学方面最早被人们认识，早在1996 年就测定完成其基因组DNA序列。酿酒酵母有16条染色体，约6 000个可读框(ORF)，仅4%的基因有内含子，因此酿酒酵母是非常理想的真核表达宿主菌，一直被称为真核生物中的“大肠杆菌”，是目前常用的表达系统之一，能方便地构建出各种缺陷株以满足各种基因表达的需要。

3. 外源基因表达

利用酿酒酵母为宿主系统目前实现了多种外源基因表达，如乙型肝炎疫苗、人胰岛

素、人粒细胞集落刺激因子和人血管抑制素等。

酿酒酵母表达系统表达外源基因的优点很多：不需要特殊的培养条件，生长繁殖迅速；可以大规模生产目的蛋白，且工艺简单、生产成本低；不产生毒素、安全可靠。酿酒酵母在表达外源基因时，具有一定的翻译后加工能力，收获的外源蛋白质具有一定程度上的折叠加工和糖基化修饰，特别适合于表达真核生物基因，这有利于保持生物产品的活性和稳定性。外源基因可在酿酒酵母中分泌表达，通常为将重组蛋白的成熟蛋白形式与结合信息素的 Pre-Pro 序列融合。Pro 序列可用 Kex2 酶水解切除，这个步骤广泛存在于真核生物中。表达产物分泌至胞外不仅有利于纯化，而且可避免表达产物在胞内大量积累给细胞生长所带来的伤害。酿酒酵母的遗传背景清楚，容易进行遗传操作，因此第一个商品化的重组疫苗来自酿酒酵母一点也不奇怪。

但应用酿酒酵母表达系统生产外源蛋白质也有不足之处。例如，外源蛋白不均一、信号肽加工不完全、内部降解、多聚体形成等，造成表达蛋白在结构上的不一致；酿酒酵母大规模发酵过程中会产生乙醇，难以进行高密度培养，分泌效率低，一般不能高效分泌 30 kDa 以上的外源蛋白质(在酵母双杂交系统中酵母可低水平分泌分子质量为 51 kDa 的α-半乳糖苷酶)，也不能使所表达的外源蛋白质正确糖基化，而且表达蛋白的 C 端往往被截短，这些缺点限制了酿酒酵母在表达重组蛋白中的应用。

整合型载体不含自主复制序列，被整合到酵母宿主菌染色体上后稳定性好，但拷贝数很低；附加型载体，由于含有来自酵母天然质粒 2μ 复制起点序列，能够独立于酵母染色体外自主复制，拷贝数通常可达 30 拷贝以上，但在非选择条件下多不稳定，发酵生产过程中易丢失质粒。这些缺点对外源基因表达有很大的影响。

在实验室阶段，利用酿酒酵母表达目的基因的技术是非常成熟的，表达量也很高，但当扩大到工业规模时，目的蛋白表达量则迅速下降。这是酿酒酵母表达系统应用于工业的主要问题。表达量的降低也许与培养基中维持质粒高拷贝数的选择压力消失有关，从而使得质粒的拷贝数变得不稳定，导致目的基因的表达下降。

4. 高效表达策略

外源基因在酿酒酵母中的表达受到很多因素的影响，如转录水平、表达载体在细胞中的拷贝数和稳定性、胞内表达产物的加工与修饰、分泌表达产物的加工与修饰等。

外源基因在酵母中的表达水平与所选择的启动子有关，不同表达载体具有不同的特异性启动子和终止子。要使外源基因在酿酒酵母中得到高效表达必须高效启动转录。一般在构建表达载体时引入强启动子，如酵母磷酸甘油酯激酶基因启动子、乙醇脱氢酶基因启动子等。但有时强启动子启动外源基因转录将造成细胞中表达产物含量过高，而对细胞形成伤害。

由于外源基因在细胞中的拷贝数会影响相应 mRNA 的拷贝数，因此对于非整合型质粒来说，增加表达载体在细胞中的拷贝数能提高外源基因转录的 mRNA 总量。以酵母内源性多拷贝质粒为基础构建稳定的多拷贝表达载体是提高酵母表达载体拷贝数的重要途径。由于大量表达外源蛋白的过程不可能在选择培养基中进行，因而表达载体在没有选择压力情况下能否稳定保持拷贝数非常关键。将外源基因整合到染色体上可维持外源基因在细胞中的稳定性，然而多数情况下会因为在细胞中的拷贝数较低而影响其表达。适

当增加目的基因整合到酵母染色体上的拷贝数(即基因剂量)是有效提高外源基因表达量的基本策略，但整合过多的外源基因拷贝数将导致重组 DNA 的不稳定。

另外，酵母表达外源蛋白质可以是胞内的，也可以分泌到胞外。分泌到胞外对外源蛋白质本身而言更稳定，产量也较胞内形式更高，因此人们多选择具有信号肽的分泌型表达菌株。但是信号肽具有选择性，所以选择合适的信号肽对于提高某种重组蛋白质的表达量非常重要，常用的信号肽有 α-MF、PHO5、SUC2 等。影响外源基因在酵母中表达的因素还很多，如整合位点、mRNA 5′ 和 3′ 非翻译区、宿主菌的 Mut 表型、蛋白酶、表达蛋白质自身的特点、培养基及培养的环境条件等。有效控制各种影响表达的因素，对于外源基因的高效表达是必不可少的。

第二节　外源基因在酿酒酵母表达系统中的表达

Materials

(1) 大肠杆菌培养相关设备与试剂

(2) 质粒提取相关设备与试剂

(3) DNA 连接相关设备与试剂

(4) 琼脂糖凝胶电泳相关设备与试剂

(5) 酸洗玻璃珠(Φ = 0.4~0.6 mm)

(6) 质粒 pMID I-AtGSTZ(附录七)

(7) 引物

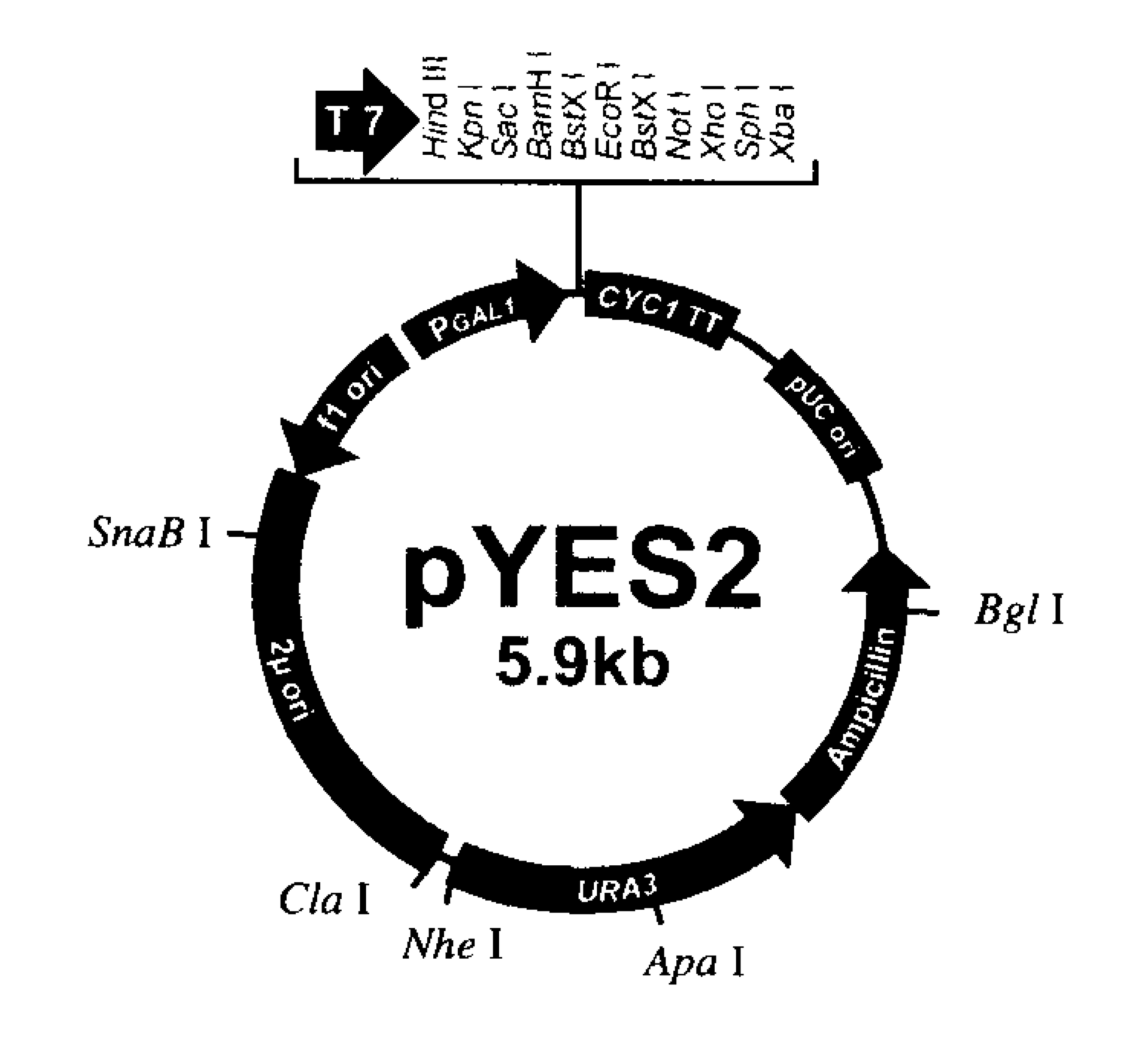
上游引物 GSTZ-At 序列为 5′-cggaattcaaaatggcaaattcgggcgaagag-3′(下画线为 *Eco*R I 识别位点)

下游引物 GSTZ-rev 序列为 5′-gatgatgatgggcggccgcgatggtgga-3′ (下画线为 *Not* I 识别位点)

(8) 酵母 INVSc1 株

(9) pYES2

pYES2 是为酿酒酵母可诱导表达重组蛋白而设计的一个大小为 5 856 bp 的质粒(下图)。利用这个质粒载体可以通过尿嘧啶原养型筛选转化子。pYES2 载体包含以下元件：①酵母 *GAL1* 启动子，此启动子在酵母中可被半乳糖诱导高效表达蛋白，而被葡萄糖所阻遏；②多克隆位点；③*CYC1* 转录终止子，能够有效终止 mRNA 转录；④*ura3* 基因，用于 *ura*3 基因型酵母宿主菌中转化子的筛选；⑤氨苄青霉素抗性基因，用于在大肠杆菌中的筛选



GAL1 启动子：1~451 bp；T7 启动子位点：475~494 bp；多克隆位点：501~600 bp；*CYC1* 转录终止子：608~856 bp；pUC 原点：1038~1711 bp；氨苄青霉素抗性基因：1856~2716 bp(互补链)；*ura3* 基因：2734~3841 bp(互补链)；2μ 原点：3845~5316 bp；f1 原点：5384~5839 bp(互补链)

(10) 聚乙二醇(PEG4000，分子质量 4000 Da)

加水至终浓度 50%(*m/V*)，用 0.45 μm 滤膜过滤除菌。也可将 PEG 溶液进行高压灭菌，但须确保 PEG 溶液处于适当浓度。此外，重要的是将 PEG 溶液保存于密封容器中，以防水分蒸发导致溶液浓度升高。在转化反应中，只要稍微改变最适浓度(33%)，就会降低转化率

(11) 单链担体 DNA (2.0 mg/mL) [a]

称 200 mg DNA 溶于 100 mL TE 缓冲液中。用 10 mL 注射器反复上下抽动使 DNA 分散均匀，然后置于磁力搅拌器中剧烈搅拌 2~3 h 直至完全溶解，或将溶液密封，置低温室内搅拌过夜。分装 DNA 样品(每份 100 μL 较适宜)，置−20℃条件下保存。使用前，每份 DNA 样品在沸水浴中煮沸 5 min 后，冰上骤冷

a. 注意：①担体 DNA 煮沸后，冷冻，可重复使用 3~4 次。如果煮过的担体 DNA 转化效率开始下降时，那么就要重新煮，或用另一份新 DNA 样品。②在该转化法中，用较低浓度(2.0 mg/mL)担体 DNA 较为适宜，重复性也好。③在早期方法中，用苯酚/氯仿抽提可确保最高转化率。如果所用 DNA 质量好，就没必要抽提，可事先测试一下 DNA 质量以决定是否需要抽提。

(12) 1.0 mol/L LiAc

用无离子水配制 1.0 mol/L 母液，过滤除菌，此溶液无需进行标定，但最终 pH 应在 8.4~8.9

(13) 转化混合液

PEG4000(50%, *m/V*)	240 μL
1.0 mol/L LiAc	35 μL
单链担体 DNA (2.0 mg/mL)	25 μL
质粒 DNA (0.1~10 μg)	50 μL

按顺序 [b] 小心加入

(14) YPD 平板或 YPAD 培养基(附录一)

(15) SC 缺省培养基或平板 [c]

(16) 0.67% YNB(无氨基酸)

(17) 诱导培养基(加有 2% 半乳糖的 SC-U 培养基)

(18) 诱导培养基 [d]

b. 按顺序加入是很重要的。应考虑最先加入 PEG4000 可保护细胞免受高浓度 LiAc 的不利影响。

c. 省却尿嘧啶用来筛选 pYES2 转化子。

d. 如果是进行诱导培养，则将 SU 培养基碳源改为 2%半乳糖或 1%棉子糖。

(19) 氨基酸混合物

0.01% 腺嘌呤、精氨酸、半胱氨酸、亮氨酸、赖氨酸、苏氨酸、色氨酸、尿嘧啶混合物

0.005% 天冬氨酸、组氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、酪氨酸、缬氨酸混合物

(20) 破碎缓冲液

50 mmol/L Na_3PO_4，pH 7.4

1 mmol/L EDTA

5%甘油

1 mmol/L PMSF

Protocols　　　　Times：7 d

(1) 构建重组质粒

ⓐ PCR 扩增目的片段：

94℃预变性 5 min，94℃、40 s，58℃、32 s，72℃、90 s 重复 35 个循环后，72℃再延伸 7 min。

↓

ⓑ 扩增产物经 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切。

↓

ⓒ 琼脂糖凝胶电泳回收合适长度的 DNA 片段。

↓

ⓓ pYES2 双酶切并进行脱磷酸化处理。

↓

ⓔ ⓒ、ⓓ酶切后的片段一起加入到含 T4 DNA 连接酶的连接体系中，并在 12℃下保温 16 h。

↓

ⓕ 连接子转化进大肠杆菌 DH5α-FT 细胞中，通过氨苄青霉素抗性筛选转化子。

↓

ⓖ 大量提取重组质粒便于进一步转化酵母。

(2) 活化酵母菌株

ⓐ 挑取 INVSc1，接种于 YPD 平板，30℃培养。

↓

ⓑ 稳定生长后，可以通过挑取单菌落接种于补充了特定氨基酸的 SC 省却平板上以确定其表现型。INVSc1 菌株不能在省却组氨酸、亮氨酸、色氨酸或尿嘧啶的 SC 培养基上生长。

↓

ⓒ 在 SC-U 省却平板上挑选转化子，转化子应该表现为尿嘧啶原养型，一旦确定了转化子，纯化该克隆，并在甘油中长期保存[e]。

(3) LiAc 法转化酿酒酵母[f]

ⓐ 将酵母 INVSc1 接种于 5 mL 液体 YPAD 或 10 mL SC，30℃振荡培养过夜。

e. 含有 pYES2 的保存细胞应保存于含有 2% 棉子糖或 2%葡萄糖的 SC-U 培养基中。

f. 用 pYES2 载体做一负对照来检验你的结果。

↓

ⓑ 计数过夜培养物的细胞密度，以最终 5×10^6 个/mL 细胞密度接种于 50 mL YPAD 培养液中。

↓

ⓒ 置 30℃、200 r/min 振荡培养至细胞密度为 2×10^7 个/mL，通常需要 3~5 h，该培养物的细胞足够供 10 次转化用[g]。

g. ①重要的是让细胞至少完成 2 次分裂；②在细胞的 3~4 次分裂期间，转化效率恒定。

↓

ⓓ 用 50 mL 无菌离心管以 3000 *g* 离心 5 min，收获细胞。

↓

ⓔ 弃培养液，把细胞悬浮在 25 mL 无菌水中，再重复上述离心步骤。

↓

ⓕ 弃上清，把细胞悬浮在 1 mL 100 mmol/L LiAc 中，将悬浮液转至无菌 1.5 mL 离心管中。

↓

ⓖ 高速离心 5 s 沉淀细胞，用微量移液器吸出 LiAc 溶液。

↓

ⓗ 直至终体积至 500 μL (2×10^9 个/mL)，其中大约含 400 μL 100 mmol/L LiAc [h]。

↓

ⓘ 将 1 mL 单链担体 DNA 样品煮沸 5 min [i]，冰中骤冷。

↓

ⓙ 振荡细胞悬浮液，取 50 μL 样品加到标记的离心管中，离心以沉淀细胞，用微量移液器除去 LiAc。

↓

ⓚ 剧烈振荡每个反应管直至细胞完全混匀，通常需要 1 min。

↓

ⓛ 30℃保温 30 min。

↓

ⓜ 42℃水浴热击 20~25 min [j]。

↓

ⓝ 6000~8000 r/min 离心 15 s，用微量移液器除去转化混合液。

↓

ⓞ 吸 0.2 ~1.0 mL 无菌水加到反应管中，用移液器上下轻轻抽提以悬浮沉淀 [k]。

↓

ⓟ 用等份 200 μL 转化混合液涂选择平板。

h. 如果ⓒ中培养物的细胞数量大于 2×10^7 个/mL，增加ⓗ中 LiAc 体积以维持 2×10^9 个/mL 的悬浮细胞量。如果ⓒ中培养物的细胞量低于 2×10^7 个/mL，则应减少ⓗ中 LiAc 的量。

i. 没有必要每次都煮沸担体 DNA，保持小份在冰盒里，冻溶 3~4 次后，需再煮沸，取出后应保持在冰上。

j. 最适热击时间随酵母种类的不同而异。如果需要获得高转化频率，事先测试最佳时间。

k. 如果想获得高转化频率，这一步需尽可能温和操作。

(4) 重组蛋白的表达 [l]

ⓐ 接种含有重组质粒的 INVSc1 单克隆于 15 mL 含 2% 棉子糖或 2% 葡萄糖的 SC-U 培养基中，30℃振荡过夜培养。

↓

ⓑ 测定过夜培养物的 A_{600} 值，计算所需过夜培养物总量，应使 50 mL 可诱导培养基的 A_{600} 值达到 0.4 [m]。

↓

ⓒ 取经过第ⓑ步计算得到的过夜培养物量，于 4℃、1500 *g* 离心 5 min 收集菌体细胞。

↓

ⓓ 用 1~2 mL 诱导培养基重悬细胞，并接种于 50 mL 诱导培养基中，30℃振荡过夜培养。

↓

ⓔ 加入诱导培养基后，分别于 0、2、4、6、8、10 h 收获细胞。于每一时间点取出 5 mL 培养物测定 A_{600} 值。

↓

ⓕ 4℃、1500 *g* 离心 5 min 收集菌体细胞。

l. 如果是第一次测定重组蛋白的表达，建议最好做一时间梯度实验以确定最佳重组蛋白表达时间(如经过半乳糖诱导后 0、2、4、6、8、10 h)。

m. 例如，假定每毫升过夜培养物的 A_{600} 值为 3，则使 50 mL 培养基 A_{600} 值达到 0.4 时所需的过夜培养物量是 $(0.4\times50)/3 = 6.67$ mL。

↓

ⓖ 弃上清，加 500 μL 无菌水重悬沉淀。

↓

ⓗ 将细胞轻轻转入一无菌小离心管中。最高转速离心 30 s。

↓

ⓘ 弃上清。

↓

ⓙ 将细胞沉淀储存于−70℃备用。

(5) 重组蛋白的提取

通常用酸洗玻璃珠法裂解细胞。

ⓐ 用冷冻细胞或新鲜细胞来制备细胞裂解液[n]。

n. 在裂解细胞之前应该知道样品的 A_{600} 值。

↓

ⓑ 用 500 μL 破碎缓冲液重悬新鲜或冷冻细胞，4℃、1500 *g* 离心 5 min。

↓

ⓒ 弃上清，用一定体积破碎缓冲液重悬细胞使 A_{600} 值在 0.50~1.00。按照前面介绍的方法计算，确定所需破碎缓冲液的使用量。

↓

ⓓ 加等体积酸洗玻璃珠。

↓

ⓔ 用旋涡振荡器混合 30 s，冰上放置 30 s，如此重复 4 次以裂解细胞。

↓

ⓕ 最高转速离心 10 min。

↓

ⓖ 弃上清，将上清转入新离心管，以牛血清白蛋白为标准，测定裂解液的蛋白质含量。

↓

ⓗ 进行 SDS-PAGE 电泳检测蛋白质表达，并测定表达酶比活力。

?…Questions………………

1. 酿酒酵母表达系统中使用的载体与菌株有何特点？
2. 酿酒酵母表达系统适合哪类基因的表达？
3. 与大肠杆菌表达系统相比，酿酒酵母表达系统在操作上有何特别之处？
4. 有几种针对酿酒酵母表达系统的转化方法？其原理分别是什么？
5. 在酿酒酵母表达系统中，目的蛋白的产量在什么水平？
6. 如何针对你所研究的目的基因选择合适的载体和菌株以利用酿酒酵母进行表达？

第三十章　毕赤酵母表达系统

第一节　宿　　主

毕赤酵母又叫做甲醇酵母，作为真核基因表达宿主菌，其表达量通常超过酿酒酵母，因此是目前常用的表达系统之一。目前常用的毕赤酵母菌株几乎都是组氨酸脱氢酶基因(*his4*)的突变株(表 30-1)，因此 *his4* 基因是主要的选择标记基因。

表 30-1　常用的毕赤酵母菌株

菌株	基因型	表现型
Y11430	野生型	Mut^+ His^+
GS115	*his4*	Mut^+ His^-
KM71	*aox1*△∷*SARG4*、*his4 arg4*	Mut^- His^-
MC100-3	*aox1*△∷*SARG4*、*aox2*△∷*Phix4*、*his4 arg4*	Mut^S His^-
SMD1168	*pep4*△*his4*	Mut^+ His^- 蛋白酶缺陷
SMD1165	*pbr1 his4*	Mut^+ His^- 蛋白酶缺陷
SMD1163	*pep4 pbr*1 *his4*	Mut^+ His^- 蛋白酶缺陷

以巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)为宿主的目的基因表达系统近年来发展最为迅速，具有高效、实用、简便、表达量高、生物学活性强等优点。此外，该系统非常适合扩大成工业规模，已被美国 FDA 评价为安全的表达系统。自 Invitrogen 公司开发系列的毕赤酵母表达系统以来，短短几年已有 300 多种目的蛋白在该系统中得到了高效表达，被认为是目前最有效的酵母表达系统。毕赤酵母系统除具有一般酵母所具有的特点外，还有以下几个优点：

(1) 具有醇氧化酶 *AOX* 基因启动子，这是目前最强、调控机制最严格的启动子之一；

(2) 表达质粒能在基因组的特定位点以单拷贝或多拷贝的形式稳定整合；

(3) 菌株易于进行高密度发酵，目的蛋白表达量高；

(4) 毕赤酵母中存在过氧化物酶体，表达的蛋白质储存其中，可免受蛋白酶的降解，而且可减少对细胞的毒害。

第二节　重　　组

表 30-2 列举了常用的毕赤酵母表达载体。毕赤酵母菌体内无天然质粒，因此表达载体需与宿主染色体发生同源重组，将目的基因表达框架整合于染色体中以实现目的基因的表达，即为整合型载体。

表 30-2　用于毕赤酵母的表达载体

载体	标记	启动子	特性
pHILD2	*his4*	*AOX*1	用 *Not* I 切割进行基因重组
pA0815	*his4*	*AOX*1	多拷贝载体
pPIC3(K)	*his4*	*AOX*1	K：抗卡那霉素
pHILS1	*his4*	*AOX*1	使用 *PHO*1 分泌信号
pPIC9(K)	*his4*	*AOX*1	使用 α 因子前导肽序列。K：抗卡那霉素
pHW010	*his4*	*GAP*	使用组成型启动子
pPICZ(α)	ble^r	*AOX*1	α：使用 α 因子前导肽序列，多拷贝，含组氨酸标签和 myc 表原标记
pGAPZ(α)	ble^r	*GAP*	组成型启动子。α：使用 α 因子前导肽序列，多拷贝，含组氨酸标签和 myc 表原标记

有些表达载体(如 pPIC9)所表达的蛋白质分泌到胞外，因此除启动子、多克隆位点、终止子、筛选标记等元件外，在 N 端还带有一段信号肽序列，引导目的蛋白进入分泌途径，分泌效率高的信号肽多为酿酒酵母 α 因子的前导肽序列。使用的启动子多为受甲醇严格控制的乙醇氧化酶基因(*AOX*1)启动子，如 pPIC9K(图 30-1)。该启动子在甲醇的诱导下，目的基因表达量占可溶性蛋白质总量的 30%以上。

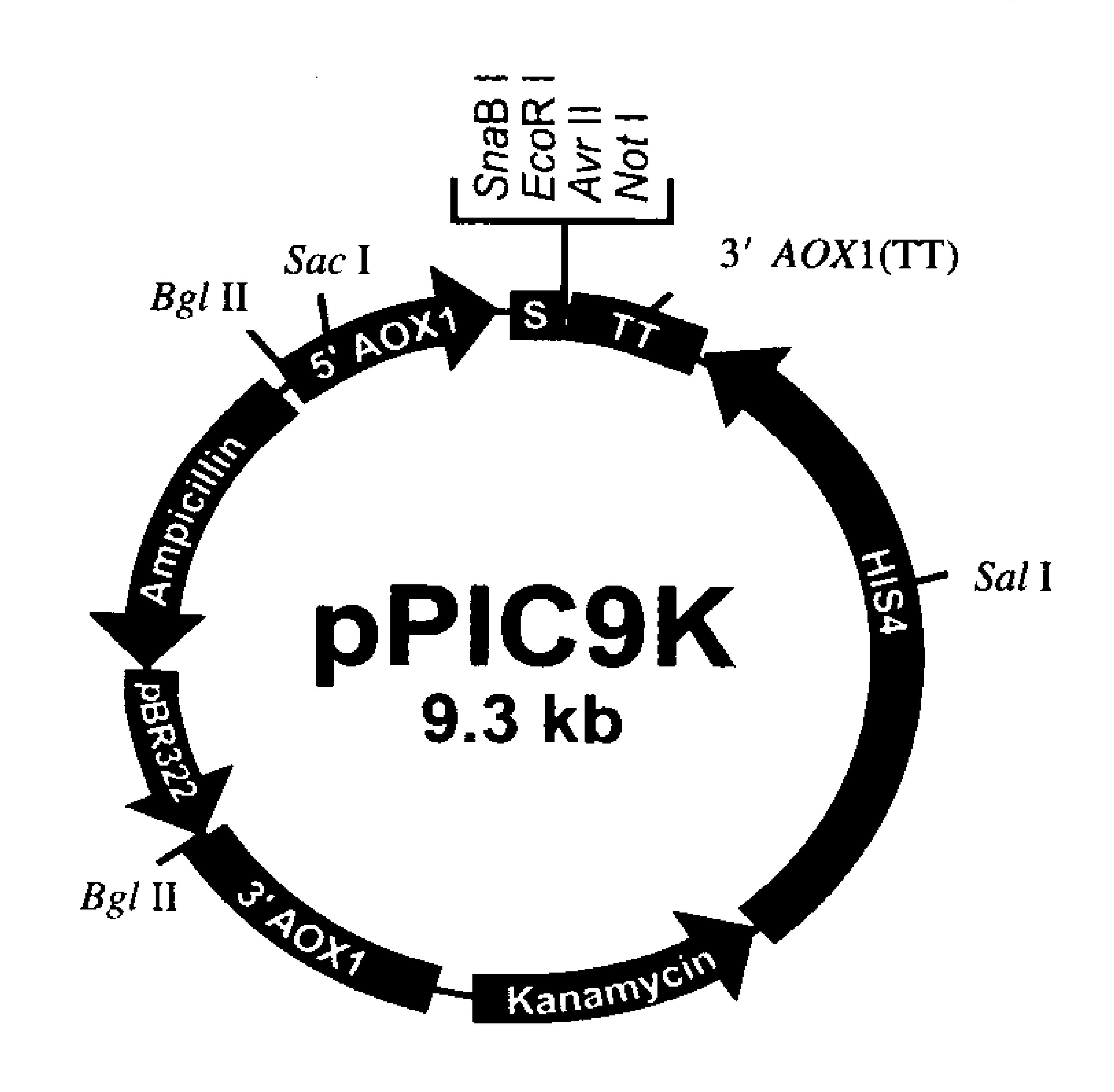


图 30-1　载体 pPIC9K 的结构

共 9276 个核苷酸。5′ *AOX*1 启动子片段：1~948 bp。5′ *AOX*1 引物位点：855~875 bp。α-因子分泌信号：949~1218 bp。α-因子插入标记：1152~1172 bp。多克隆位点：1192~1241 bp。3′ *AOX*1 引物位点：1327~1347 bp。3′ *AOX*1 转录终止区：1253~1586 bp。*HIS4* ORF：4514~1980 bp。卡那霉素抗性基因：5743~4928 bp。3′ *AOX1* 片段：6122~6879 bp。pBR322 原点：7961~7288 bp。氨苄青霉素抗性基因：8966~8106 bp

1. 酵母菌株的分离纯化

Materials

(1) 30℃摇床　　(2) YPD 培养基(附录一)

Protocols Times：3 d

ⓐ 接种 KM71 于 5 mL YPD 液体培养基中。

↓

ⓑ 30℃、250~300 r/min 振荡过夜。

↓

ⓒ 涂布 YPD 平板，30℃培养 48 h。

↓

ⓓ 用 YNB 基本培养基和含 His 的补充培养基接种，挑选在补充培养基上生长而在基本培养基上不生长的单菌落划 YPD 平板，4℃保存。

2. 电转化

毕赤酵母转化方法有 4 种(表 30-3)，最常用的是电转化法和原生质体法。其中电转化法最方便，转化效率最高，最容易产生多拷贝整合。

表 30-3 毕赤酵母常用的转化方法

转化方法	转化频率/μg	方便系数	多拷贝整合
原生质体法	10^5	低	有
PEG1000 法	10^3	高	无
电转化法	10^5	高	有
LiAc 法	10^2	高	无

Materials

(1) MD 琼脂培养基

1.34% 酵母氮源

0.4 mg/L 生物素

2% 右旋葡萄糖

2% 琼脂

(2) 电转化仪(Bio-Rad 公司)

(3) YPD 培养基(附录一)

(4) 1 mol/L 山梨醇

(5) TE

Protocols Times：4 d

ⓐ 挑取酵母单菌落，接种至 5 mL YPD 培养基中。

↓

ⓑ 30℃、250~300 r/min 培养过夜(预培养)。

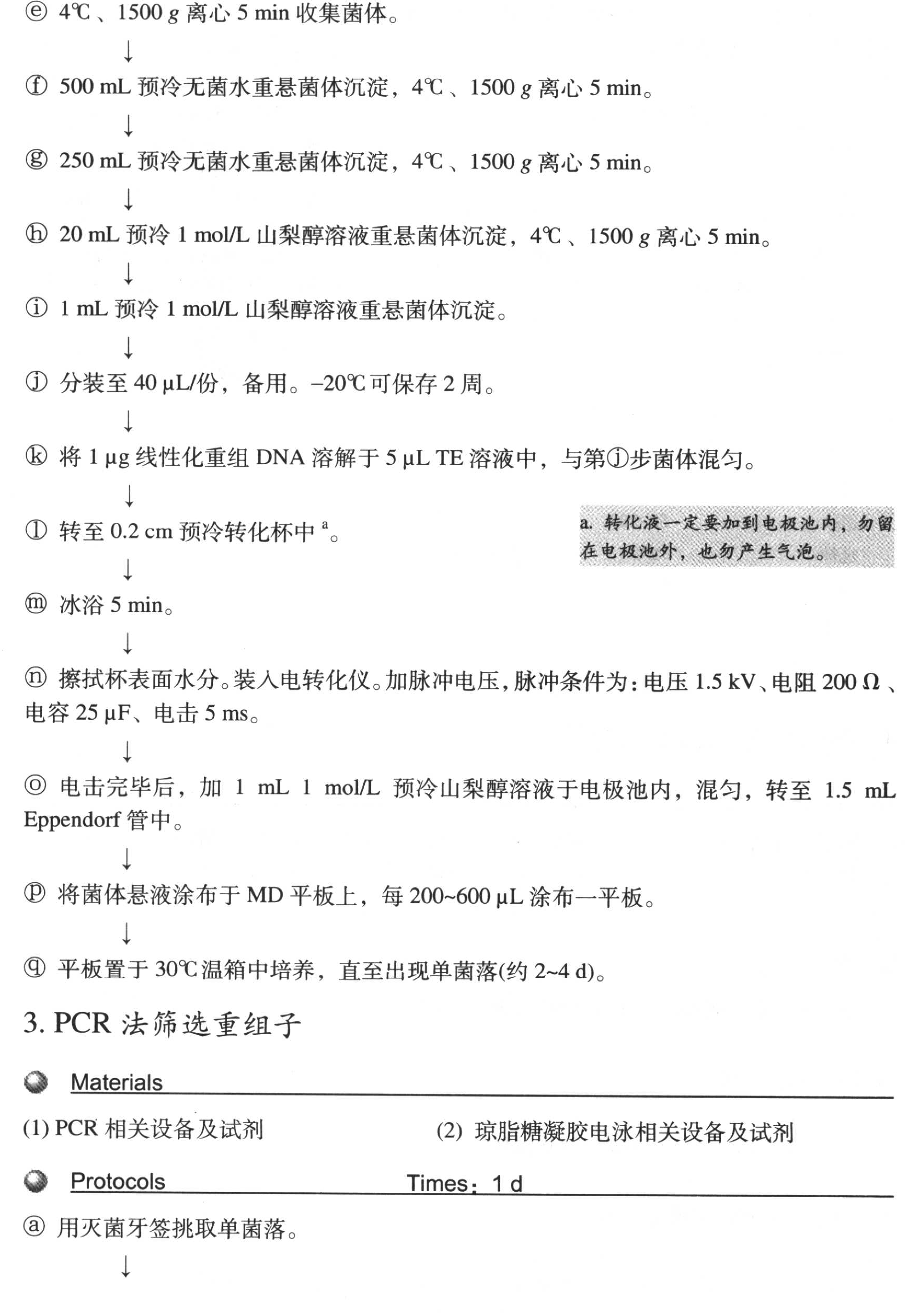
↓

ⓒ 取 100~500 μL 培养物接种至含 500 mL 新鲜 YPD 培养基的 2 L 三角瓶中。

↓

ⓓ 28~30℃、250~300 r/min 培养过夜，至 A_{600} 达 1.3~1.5。

↓



ⓔ 4℃、1500 *g* 离心 5 min 收集菌体。

↓

ⓕ 500 mL 预冷无菌水重悬菌体沉淀，4℃、1500 *g* 离心 5 min。

↓

ⓖ 250 mL 预冷无菌水重悬菌体沉淀，4℃、1500 *g* 离心 5 min。

↓

ⓗ 20 mL 预冷 1 mol/L 山梨醇溶液重悬菌体沉淀，4℃、1500 *g* 离心 5 min。

↓

ⓘ 1 mL 预冷 1 mol/L 山梨醇溶液重悬菌体沉淀。

↓

ⓙ 分装至 40 μL/份，备用。−20℃可保存 2 周。

↓

ⓚ 将 1 μg 线性化重组 DNA 溶解于 5 μL TE 溶液中，与第ⓙ步菌体混匀。

↓

ⓛ 转至 0.2 cm 预冷转化杯中[a]。

a. 转化液一定要加到电极池内，勿留在电极池外，也勿产生气泡。

↓

ⓜ 冰浴 5 min。

↓

ⓝ 擦拭杯表面水分。装入电转化仪。加脉冲电压，脉冲条件为：电压 1.5 kV、电阻 200 Ω、电容 25 μF、电击 5 ms。

↓

ⓞ 电击完毕后，加 1 mL 1 mol/L 预冷山梨醇溶液于电极池内，混匀，转至 1.5 mL Eppendorf 管中。

↓

ⓟ 将菌体悬液涂布于 MD 平板上，每 200~600 μL 涂布一平板。

↓

ⓠ 平板置于 30℃温箱中培养，直至出现单菌落(约 2~4 d)。

3. PCR 法筛选重组子

Materials

(1) PCR 相关设备及试剂

(2) 琼脂糖凝胶电泳相关设备及试剂

Protocols　　Times：1 d

ⓐ 用灭菌牙签挑取单菌落。

↓

ⓑ 在盛有 10 μL 无菌水的编有特殊号码的 PCR 管中涮洗一下后，再在贴有标签纸的平板的某个编号对应培养基上插一下[a]。

↓

ⓒ 在每管中加入如下 PCR 反应液[b, c]：

PCR 专用水	3.9 μL
10×反应缓冲液	2.0 μL
25 mol/L $MgCl_2$	1.2 μL
2.5 mol/L dNTP	1.6 μL
引物 1[d] (10 μmol/L)	0.6 μL
引物 2[d] (10 μmol/L)	0.6 μL
Taq DNA 聚合酶[e]	0.1 μL

↓

ⓓ PCR 扩增[f]：

预变性	94℃	5 min	
变性	94℃	30 s	30 个循环
退火	50~58℃	30 s	30 个循环
延伸	72℃	90 s	30 个循环
结束延伸	72℃	7 min	
保存	4℃	∞	

↓

ⓔ 取 5 μL 进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

a. 注意，勿混淆编号！

b. 引物最好使用试剂盒中已有的专用检测引物；或者一条为载体引物，一条为基因特异引物(这样做可以鉴定非定向克隆方向)。

c. 多管相同的混合液最好一起配制，然后分管。

d. 信号肽切割位点为 Lys- Arg，引物设计时应特别注意。引物设计时要在序列的 5′ 端引入保护碱基。

e. 应使用高保真的 DNA 聚合酶。

f. 扩增条件取决于引物、模板。

4. 毕赤酵母基因组的提取

Materials

(1) YPD 培养基(附录一)

(2) TE(附录一)

(3) 溶菌酶

(4) 苯酚/氯仿/异戊醇(25∶24∶1，*V*/*V*/*V*) (附录一)

(5) 3 mol/L NaAc(pH5.2) (附录一)

(6) 100% 乙醇、75% 乙醇

Protocols　　Times：12 h

ⓐ 接种重组和空质粒转化子于 5 mL YPD 培养基中。

↓

ⓑ 30℃、培养 16~18 h。

↓

ⓒ 室温、1500 *g* 离心 5~10 min 收集菌体。

↓

ⓓ 100 μL TE(pH 7.0)重悬菌体。

↓

ⓔ 加入 300 μL EDTA(pH 8.0)、0.07 mol/L Tris · HCl、3 μL *β*-巯基乙醇、1 mg 溶菌酶。

↓

ⓕ 37℃水浴 30 min。

↓

ⓖ 10 000 *g* 离心 5~10 min。

↓

ⓗ 弃上清，加 90 μL TE 重悬沉淀。

↓

ⓘ 加 200 μL 饱和酚、200 μL 氯仿，混匀后 10 000 *g* 离心 30 s。

↓

ⓙ 取上层水相，加 2 倍体积无水乙醇及 1/10 体积 NaAc，−20℃放置 30 min 以上。

↓

ⓚ 10 000 *g* 离心 20 min，弃上清。

↓

ⓛ 75%乙醇漂洗沉淀一次。

↓

ⓜ 干燥，沉淀溶于 15 μL TE 或双蒸水中，−20℃保存备用。

第三节　重组基因的表达

1. Mut^+型重组酵母的诱导表达

Materials

(1) 控温摇床

(2) Western 印迹相关设备及试剂

(3) 活性实验相关设备及试剂

(4) SDS-PAGE 相关设备及试剂

(5) BMGY 培养基

1% 酵母提取物

2% 胰蛋白胨

100 mmol/L 磷酸钾(pH6.0)

1.34% 酵母氮源

0.4 mg/L 生物素

1% 甘油

(6) BMMY 培养基

1% 酵母提取物

2% 胰蛋白胨

100 mmol/L 磷酸钾(pH6.0)

1.34% 酵母氮源

0.4 mg/L 生物素

0.5% 甲醇

(7) 100%甲醇

Protocols　　Times：5 d

ⓐ 挑选一单菌落，置于装有 25 mL BMGY 培养基的 250 mL 三角瓶中，于 28~ 30℃、250~300 r/min 培养至 A_{600} = 2~6 (约 16~18 h)。

↓

ⓑ 室温下 1500~3000 *g* 离心 5 min，收集菌体，用BMMY重悬于 1 L 三角瓶中，至 A_{600} = 1.0 (约 100~200 mL)。

↓

ⓒ 28~30℃、250~300 r/min 摇床上继续培养。

↓

ⓓ 每隔 24 h 往培养基中添加 100%甲醇，至终浓度 0.5%~1.0%。

↓

ⓔ 按时间点分别取菌液样品，取样量为 1 mL，置于 1.5 mL Eppendorf 管中，最大转速离心 2~3 min，分别收集上清和菌体，分析目的蛋白的表达量和菌液最佳收获时间。时间点一般取 0、6、12、24、36、48、60、72、84 和 96 h。

↓

ⓕ 对分泌表达类型，分离收集上清液；对胞内表达类型，分离收集菌体沉淀，用液氮或干冰速冻，于−70℃保存备用。

↓

ⓖ 用 SDS-PAGE、Western 印迹及活性实验来检测和鉴定重组蛋白。

2. Mut^-型重组酵母的表达诱导

Materials

(1) 控温摇床
(2) Western 印迹相关设备及试剂
(3) 活性实验相关设备及试剂
(4) SDS-PAGE 相关设备及试剂
(5) 100%甲醇
(6) BMGY 培养基(同 Mut^+型重组酵母中 BMGY 培养基)
(7) BMMY 培养基(同 Mut^+型重组酵母中 BMMY 培养基)

Protocols　　Times：5 d

ⓐ 挑选一单菌落，置于装有 25 mL BMGY 培养基的 250 mL 三角瓶中，于 28~30℃、250~300 r/min 培养至 A_{600} = 2~6 (约 16~18 h)。

↓

ⓑ 室温下 1500~3000 *g* 离心 5 min，收集菌体，用原培养体积 1/10~1/5 的 BMMY 重悬菌体(约 10~20 mL)于 100 mL 三角瓶中。

↓

ⓒ 28~30℃、250~300 r/min 摇床上继续培养。

↓

ⓓ 每隔 24 h 往培养基中添加 100% 甲醇至终浓度 0.5%~1.0%。

↓

ⓔ 按时间点分别取菌液样品，取样量为 1 mL，置于 1.5 mL Eppendorf 管中，最大转速离心 2~3 min，分别收集上清和菌体，分析目的蛋白的表达量和菌液最佳收获时间。时间点一般取 0、24、48、72、96 和 120 h。

↓

ⓕ 对分泌表达类型，分离收集上清液；对胞内表达类型，分离收集菌体沉淀，用液氮或干冰速冻，于−70℃保存备用。

↓

ⓖ 用 SDS-PAGE、Western 印迹及活性实验来检测和鉴定重组蛋白。

…Questions………………

1. 毕赤酵母表达系统的载体与菌株有何特点?
2. 毕赤酵母表达系统适合哪类基因的表达?
3. 与酿酒酵母表达系统相比，毕赤酵母表达系统在操作上有何特别之处?
4. 有几种针对毕赤酵母表达系统的转化方法? 其原理分别是什么?
5. 在毕赤酵母表达系统中，目的蛋白的产量通常在什么水平?
6. 如何针对你所研究的目的基因选择合适的载体和菌株以利用毕赤酵母进行表达?

第五篇　附　　录

附录一 储液配制

1. 无机类

1) 1 mol/L $CaCl_2$

溶解 29.4 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 于 180 mL 双蒸水中，定容至 200 mL，用 0.22 μm 滤膜过滤除菌，分装成 10 mL/份，储存于−20℃。制备感受态细胞时，取出一小份解冻，用无菌水稀释至 100 mL 成 0.1 mol/L 工作浓度，然后骤冷至 0℃。

2) 1 mol/L $MgCl_2$

溶解 20.3 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 于一定量双蒸水中，定容到 100 mL，分装成小份并高压灭菌。注意：$MgCl_2$ 极易潮解，应选购小瓶(如 100 g)试剂，启用后勿长期存放。

3) 3 mol/L NaAc(pH5.2 或 pH7.0)

溶解 40.8 g $NaAc \cdot 3H_2O$ 于 80 mL 双蒸水中，用冰醋酸调节 pH 至 5.2 或 7.0，加双蒸水定容到 100 mL，分装成小份并高温高压灭菌。

4) 2 mol/L NaAc(pH4.0)

称 54.4 g $NaAc \cdot 3H_2O$，溶于 20 mL RNA 专用双蒸水中，加乙酸(约 158 mL)至 pH4.0，用 RNA 专用双蒸水定容至 200 mL，高温高压灭菌后，室温保存。

2. 有机类(按字母顺序)

1) 苯酚(水饱和，RNA 实验专用)

从冰柜中取出苯酚[a, b]，在室温下放置使其达到室温后在 68℃水浴锅中使苯酚充分融解。加入 8-羟基喹啉[c]至终浓度 0.1%。再加入等体积 RNA 专用水，使用磁力搅拌器搅拌 15 min，静置待其充分分层后，除去上层水相。重复操作。分层后除去多余水分，仅保留一薄层水以防止酚氧化，置于棕色玻璃瓶中 4℃避光保存，3 个月内稳定。

2) 苯酚(Tris 饱和，DNA 实验专用)

从冰柜中取出苯酚[a, b]，在室温下放置使其达到室温后在 68℃水浴锅中使苯酚充分融解。加入 8-羟基喹啉[c]至终浓度 0.1%。再加入等体积的 1 mol/L Tris · HCl (pH8.0)，磁力

a. 大多数市售液化苯酚是清亮无色的，无需重蒸便可用于分子生物学实验。但有些液化苯酚呈粉红色或黄色，应避免使用。同时也应避免使用结晶苯酚，结晶苯酚必须在 160℃对其进行重蒸以去除诸如醌等氧化产物，因为醌类氧化产物可引起磷酸二酯键的断裂或导致 RNA 和 DNA 的交联等，因此苯酚的质量对 DNA、RNA 的提取极为重要。

b.苯酚腐蚀性极强，可引起严重灼伤，操作时应戴手套及防护镜等。所有操作均应在通风橱中进行，与苯酚接触过的皮肤部位应用大量水清洗，并用肥皂洗涤，忌用乙醇。

c. 防止酚氧化的作用。也是一种还原剂、RNA 酶的不完全抑制剂及金属离子的弱螯合剂，同时因其呈黄色，便于识别有机相。酚氧化后呈褐色，破坏核酸结构，绝不可使用！！！

搅拌器搅拌 15 min，静置待其充分分层后，除去上层水相。重复上述操作一次。然后加入等体积的 0.1 mol/L Tris · HCl (pH8.0)。重复上述操作 2 次，残留部分上层水相。使用 pH 试纸确认有机相的 pH>7.8[d]后，置于棕色玻璃瓶中 4℃避光保存，3 个月内稳定。

3) 苯酚/氯仿/异戊醇(25∶24∶1，*V*∶*V*∶*V*)

将 Tris 饱和苯酚与等体积的氯仿[e]/异戊醇[f](24∶1，*V*∶*V*)均匀混合后，移入棕色玻璃瓶中 4℃保存。

4) 30%丙烯酰胺溶液[g]

将 29 g 丙烯酰胺和 1 g *N*, *N'*-亚甲双丙烯酰胺溶于总体积为 60 mL 双蒸水中。加热至 37℃溶解后，补加双蒸水至终体积为 100 mL。用 0.45 μm 滤膜过滤除菌，检查该溶液 pH≤7.0，置棕色瓶中 4℃可保存数月。

5) CIAA(氯仿∶异戊醇 ＝49∶1，*V*∶*V*)[h]

氯仿	98 mL
异戊醇	2 mL

混合后室温保存备用

6) 1 mol/L DTT(二硫苏糖醇)

称 3.09 g DTT 至塑料离心管中，加 20 mL 0.01 mol/L NaAc (pH5.2)，溶解后用 0.22 μm 滤膜过滤除菌后，分成小份，保存于−20℃。

7) 10 mg/mL EB(溴化乙锭)[i, j]

小心称量 200 mg EB，转移到广口瓶中，加 20 mL 双蒸水或 TE，用磁力搅拌器搅拌直到完全溶解。用铝箔纸包裹后，于 4℃储存。

8) 100 mmol/L IPTG(异丙基-*β*-*D*-硫代半乳糖苷)[k]

用双蒸水溶解 IPTG 至 100 mmol/L，0.22 μm 滤膜过滤灭菌后，分成 1 mL/小份储存于−20℃，用时再稀释 100 倍。

9) 10% SDS(十二烷基硫酸钠)

称取 10 g 高纯度 SDS 溶于 80 mL 双蒸水中。加数滴浓 HCl 调 pH 至 7.2 后定容至 100 mL。室温保存。

d. RNA 专用酚的 pH 不要超过 7.0。
e. 使蛋白质变性并有助于液相与有机相的分离。
f. 有助于消除抽提过程中出现的气泡。
g. 丙烯酰胺具有很强的神经毒性，并可通过皮肤吸收，其作用具有积累性，配制时应戴手套等。聚丙烯酰胺无毒，但也应谨慎操作，因为有可能含有少量的未聚合成分。
h. RNA 专用，所以试剂瓶应按 RNase-free 处理。
i. EB 是致癌物质，操作时应带上一次性手套。EB 见光易分解，故应置棕色试剂瓶中保存于 4℃下，染色时也应避光。若为 RNA 专用，则使用 RNA 专用水配制。工作浓度为 0.5 μg/mL。
j. EB 溶液净化处理方法：由于 EB 具有一定的毒性，实验结束后，应对含 EB 的溶液进行净化处理再行弃置，以避免污染环境和危害人体健康。
(1) 大于 0.5 mg/mL 浓度的 EB 溶液处理：①用水稀释 EB 溶液至浓度低于 0.5 mg/mL；②加等体积 0.5 mol/L $KMnO_4$，充分混合后，室温放置数小时；③再加入等体积 1.5 mol/L HCl，混匀后，室温放置数小时；④再加入等体积 1.5 mol/L NaOH，混匀并废弃。
(2) 小于 0.5 mg/mL 浓度的 EB 溶液处理：①按 1 mg/mL 量加入活性炭，不时轻摇混匀，室温放置 1 h；②用滤纸过滤并将活性炭与滤纸密封后丢弃。
(3) 固体 EB 废弃物可用高温消毒方法处理(EB 高温分解)。
k. 含有该试剂的平板不能长期保存，易分解(特别是见光极易分解)。因此，用前涂于平板上。

10) 20 mg/mL X-gal(5-溴-4-氯-3-吲哚-β-半乳糖苷)[1]

1. 见光易分解，应用铝箔纸包裹。

称 1 g X-gal 溶于 50 mL *N*, *N*-二甲基甲酰胺。然后分装成 1 mL/小份，用铝箔包裹，储存于−20℃。蓝白筛选时涂于平板表面，浓度稀释 50 倍。

3. 酶类(按字母顺序)

1) 100 mg/mL 蛋白酶 K

将 100 mg 蛋白酶 K[a]，溶于 1 mL 双蒸水中，轻轻摇动，直至蛋白酶 K 完全溶解。不要旋涡混合。溶解后分装成 250 μL/小份储存于−20℃冰箱中[b]。

a. 应避免蛋白酶 K 混入蛋白质相关试剂或扩散到空气中。称量后应彻底清扫天平上的残留物。
b. 蛋白酶 K 较稳定，冻融对酶活不产生影响。−20℃可保存半年。

2) 2×蛋白酶 K 缓冲液

1 mol/L Tris · HCl(pH7.5)	20 mL
5 mol/L NaCl	6 mL
0.5 mol/L Na_2EDTA	5 mL
10% SDS	20 mL
RNA 专用水	49 mL
总体积	100 mL

用前加 16 μL 20 mg/mL 蛋白酶，室温放置[c]

c. 2×蛋白酶 K 缓冲液遇冷，则其中的 SDS 析出，因此应室温保存。蛋白酶 K 较稳定，室温下放置一段时间不影响酶的活性。

3) 10 mg/mL RNase A(无 DNase)

溶解 10 mg RNase A 于 1 mL 10 mmol/L 乙酸钠水溶液中(pH 5.0)。溶解后于沸水浴中煮沸 15 min，使 DNase 失活。用 1 mol/L Tris · HCl 调 pH 至 7.5，于−20℃储存(配制过程中要戴手套)。

4. 缓冲液类(按字母顺序)

1) 50×Denhardt 试剂

称 5 g 聚蔗糖(Ficoll，400 型)、5 g 聚乙烯吡咯烷酮(PVP-40)、5 g BSA(组分 V)，加双蒸水定容至 500 mL，0.45 μm 滤膜过滤除菌及杂质，分装成小份于−20℃储存。

2) DEPC(焦碳酸二乙酯)处理水

加 100 μL DEPC 于 100 mL 双蒸水中，37℃温浴至少 12 h，然后高压灭菌 20 min，使残余 DEPC 失活。DEPC 遇胺起化学反应，不可用 DEPC 处理 Tris 缓冲液。

3) 10×点样缓冲液(RNA 电泳用)

称 25 mg 溴酚蓝、25 mg 二甲苯青 FF、5 mL 甘油，另加 200 μL 0.5 mol/L EDTA (pH8.0)，用 DEPC 水定容到 10 mL，分装后保存于 4℃，备用。

4) 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(25℃)

按下表给定体积，混合 1 mol/L NaH_2PO_4 和 1 mol/L Na_2HPO_4 储液，稀释至 1 L，获得所需 pH 磷酸缓冲液。

1 mol/L NaH_2PO_4 储液：溶解 138 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 于足量双蒸水中，使终体积至 1 L。

1 mol/L Na_2HPO_4 储液：溶解 142 g Na_2HPO_4 于足量双蒸水中使终体积至 1 L。

pH	5.8	6.0	6.2	6.4	6.6	6.8	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8	8.0
1 mol/L Na_2HPO_4 (mL)	7.9	12.0	17.8	22.5	35.2	46.3	57.7	68.4	77.4	84.5	89.6	93.2
1 mol/L NaH_2PO_4 (mL)	92.1	88.0	82.2	74.5	64.8	53.7	42.3	31.6	22.6	15.5	10.4	6.8

5) 10×MOPS(3-[*N*-吗啉代]丙磺酸)[a]

称 41.8 g MOPS 溶于 RNA 专用水中，用 NaOH 调 pH 至 7.0，加 16.6 mL 3 mol/L NaAc(pH7.0)和 20 mL 20 mL 0.5 mol/L EDTA(pH 7.0)后，用 RNA 专用水定容至 1 L，0.22 μm 滤膜过滤除去杂质后，室温保存备用。

a. 溶液见光或高温后变黄。变黄后也可使用，但变黑后不要使用。高温高压灭菌后，MOPS 缓冲能力下降。严禁使用 DEPC 处理水来配制。

6) 10×PBS 缓冲液[b]

称 80 g NaCl、2 g KCl、14.4 g Na_2HPO_4 及 2.4 g KH_2PO_4，溶解于 800 mL 双蒸水中，用 HCl 调 pH 至 7.4，加双蒸水定容至 1 L，高温高压灭菌，室温保存备用。

b. 该 10×PBS 缓冲液中无二价阳离子，如需要，可在配方中补充 10 mmol/L $CaCl_2$ 和 5 mmol/L $MgCl_2$。

7) 20% PEG(聚乙二醇)/2.5 mol/L NaCl

称 20 g PEG6000、14.6 g NaCl，加双蒸水定容至 100 mL，并用磁力搅拌器搅拌溶解。

8) SM 缓冲液

称 2.9 g NaCl、1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 溶于双蒸水中，另加 25 mL 1 mol/L Tris · HCl(pH 7.5) 和 2.5 mL 2%明胶，用双蒸水定容至 500 mL。

9) 20×SSC

称 88.2 g 柠檬酸三钠($2H_2O$)和 175.3 g NaCl，加双蒸水至约 0.9 L，调 pH 至 7.0，再用双蒸水补足体积至 1 L。高温高压灭菌后，室温保存。

10) 20×SSPE

称 27.6 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$、7.4 g $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ 和 175.3 g NaCl，加双蒸水至约 0.9 L，调 pH 至 7.4，再用双蒸水补足体积至 1 L。高温高压灭菌后，室温保存。

11) STETL 缓冲液

称 4 g 蔗糖，加 2.5 mL 10% Triton X-100、2.5 mL 1 mol/L Tris · HCl(pH 8.0)、5 mL 0.5 mol/L EDTA，用双蒸水定容至 50 mL。过滤灭菌，4℃保存。

12) 1 mol/L Tris · HCl 缓冲液

将 121.1 g Tris 碱溶解于约 0.9 L 双蒸水中，再根据所需 pH(25℃下)加一定量的浓盐酸(11.6 mol/L)，用双蒸水调整终体积至 1 L，分装成小份并高温高压灭菌后于室温储存。

pH	9.0	8.8	8.6	8.4	8.2	8.0	7.8	7.6	7.4	7.2
浓盐酸(mL)	8.6	14.0	21.0	28.5	38.0	46.0	56.0	66.0	71.3	76.0

13) 1.5 mol/L Tris · HCl(pH8.8)

称 181.7 g Tris 置于 1 L 烧杯中。加 800 mL 双蒸水，充分搅拌溶解。用浓盐酸调节 pH 至 8.8 后定容至 1 L。高温高压灭菌后，室温保存。

14) 50×TAE [c, d]

称 242 g Tris 溶于 800 mL 双蒸水中，加 57.1 mL 冰醋酸和 100 mL 0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)，再加水定容至 1 L，室温保存备用。

c. 对于数 kb 长片段的分离多用 TAE，对于 1 kb 以下短片段的分离多用 TBE。

d. 室温下保存时出现沉淀，一般不影响电泳。但沉淀过多则应重新配制。

15) 5×TBE [c, d]

称 54 g Tris、27.5 g 硼酸溶于 800 mL 双蒸水中，加 20 mL 0.5 mol/L EDTA (pH8.0)，再加水定容至 1 L，室温保存备用。

5. 常用抗生素

抗生素	储液浓度 /(mg/mL)	溶剂 [a]	储存温度 /℃	工作浓度/(μg/mL)		工作浓度范围 /(μg/mL)
				严紧型质粒	松弛型质粒	
氨苄青霉素	50	无菌水	−20	25	50	25~200
羧苄青霉素	50	无菌水	−20	25	50	25~100
卡那霉素	10	无菌水	−20	10	50	10~100
氯霉素	34	无水乙醇	−20	25	170	25~170
链霉素	10	无菌水	−20	10	50	10~50
四环素 [b]	5	无水乙醇	−20	10	50	10~50

注：a. 以水为溶剂的抗生素储存液通过 0.22 μm 滤膜过滤除菌。以乙醇为溶剂的抗生素溶液无需除菌处理。所有抗生素溶液均应保存于不透光的容器中。

b. Mg^{2+}是四环素的拮抗剂，四环素抗性菌的筛选应使用不含镁盐的培养基(如 LB 培养基)。

6. 培养基类(按字母顺序)

a. 是最常用的培养基，用于大肠杆菌的培养。添加氨苄青霉素的 LB 培养基常写成 LA 培养基。

b. 高温高压灭菌前调 pH 至 7.2，但不调 pH 直接使用也可以。

1) LB 培养基[a]

Bacto 胰蛋白胨(DIFCO)	10 g
Bact 酵母提取物(DIFCO)	5 g
NaCl	10 g (高盐 LB)或 5 g(低盐 LB)

用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.2[b]，再补双蒸水至 1 L。

琼脂平板需添加琼脂粉 12~15 g/L (顶层培养基为 7 g/L)，高温高压灭菌。

c. 大肠杆菌合成培养基。

d. 5×M9 盐：

$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	64 g
KH_2PO_4	15 g
NaCl	2.5 g
NH_4Cl	5 g

用双蒸水定容至 1 L。高温高压灭菌。

e. 用于 λ 噬菌体感染大肠杆菌的培养。

2) M9 基本培养基[c]

5×M9 盐[d]	200 mL
1 mol/L $MgSO_4$	2 mL
20% 葡萄糖溶液	20 mL
1 mol/L $CaCl_2$	0.1 mL

用无菌水定容至 1 L。

3) NZYM 顶层琼脂培养基[e]

Bact 胰蛋白胨(DIFCO)	5 g
NaCl	5 g
NZ 胺	10 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2 g

用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.2[b]，再补双蒸水至 1 L。添加琼脂粉 7 g/L，高温高压灭菌后，分装于 15 mL 离心管中，每管加 7.5 mL，室温保存。

4) SOB 培养基

Bacto 胰蛋白胨(DIFCO)	20 g
Bact 酵母提取物(DIFCO)	5 g
1 mol/L KCl	2.5 mL
5 mol/L NaCl	2 mL

用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0，再补双蒸水至 1 L，分成 100 mL/小份，高温高压灭菌。培养基冷却到室温后，再在每 100 mL 小份中加 1 mL 灭菌的 1 mol/L $MgCl_2$ 和 1 mL 灭菌的 1 mol/L $MgSO_4$。

5) SOC 培养基[f]

f. 主要用于 DNA 转化大肠杆菌的培养。

Bacto 胰蛋白胨(DIFCO)	20 g
Bact 酵母提取物(DIFCO)	5 g
1 mol/L KCl	2.5 mL

5 mol/L NaCl	2 mL

用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0，再用双蒸水定容至 1 L，分装成每管 200 mL，高温高压灭菌。培养基冷却到室温后，再在每 200 mL 小份中加 2 mL 灭菌的 1 mol/L $MgCl_2$、2 mL 灭菌的 1 mol/L $MgSO_4$ 和 2 mL 1 mol/L 葡萄糖[g, h]。

g. 1 mol/L 葡萄糖溶液。称取 18 g 葡萄糖，用水定容至 100 mL。用 0.22 μm 滤膜过滤。

h. 往灭菌后的溶液中添加其他试剂，容易出现污染，应特别注意。对不放心的培养基，可置 37℃过夜，若不浑浊表明未被污染。

6) YPD 培养基

Bacto 胰蛋白胨(DIFCO)	20 g
Bact 酵母提取物(DIFCO)	10 g
葡萄糖	20 g

用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.2，再补双蒸水至 1 L，高压灭菌。在高压灭菌之前，对色氨酸营养缺陷型菌株每升培养基添加 1.6 g 色氨酸，因为 YPD 是色氨酸限制型培养基。为配制平板，需在高压灭菌前加入 20 g 琼脂粉。

7) 2×YT 培养基[i]

i. M13 噬菌体感染大肠杆菌的培养。

Bacto 胰蛋白胨(DIFCO)	16 g
Bact 酵母提取物(DIFCO)	10 g
NaCl	5 g

用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.2，再补双蒸水至 1 L，琼脂平板需添加琼脂粉 12 ~15 g/L。

附录二　核酸及蛋白质数据

1. 核苷三磷酸的物理常数

化合物	分子质量/Da	λ_{max}(pH7.0)	1 mol 溶液(pH7.0)中 λ_{max} 时的最大吸收值	A_{280}/A_{260}
ATP	507	259	15 400	0.15
CTP	483	271	9000	0.97
GTP	523	253	13 700	0.66
UTP	484	262	10 000	0.38
dATP	494	259	15 200	0.15
dCTP	467	271	9300	0.98
dGTP	507	253	13 700	0.66
dTTP	482	267	9600	0.71

2. 常用核酸的长度与分子质量

核酸	核苷酸数	分子质量/Da
λ DNA	48 502(双链环状)	3.0×10^{7}
pBR322	4363(双链)	2.8×10^{6}
28S rRNA	4800	1.6×10^{6}
23S rRNA	3700	1.2×10^{6}
18S rRNA	1900	6.1×10^{5}
19S rRNA	1700	5.5×10^{5}
5S rRNA	120	3.6×10^{4}
tRNA(大肠杆菌)	75	2.5×10^{4}

3. 常用核酸蛋白换算数据

1) 分光光度换算

1 A_{260} 双链 DNA = 50 μg/mL = 0.15 mmol/L

1 A_{260} 单链 DNA = 33 μg/mL = 0.10 mmol/L

1 A_{260} 单链 RNA = 40 μg/mL = 0.12 mmol/L

2) DNA 质量与摩尔的换算

A) 质量换算成摩尔

1 μg 1000 bp DNA = 1.52 pmol = 3.03 pmol 末端 = 9.1×10^{11} 分子

1 μg pUC18/19 DNA (2686 bp) = 0.57 pmol = 3.4×10^{11} 分子

1 μg pBR322 DNA (4361 bp) = 0.35 pmol = 2.1×10^{11} 分子

1 μg M13mp18/19 DNA (7249 bp) = 0.21 pmol = 1.3×10^{11} 分子

1 μg λ DNA (48 502 bp) = 0.03 pmol = 1.8×10^{10} 分子

B) 摩尔换算成质量

1 pmol 1000 bp DNA = 0.66 μg

1 pmol pUC18/19 (2686 bp) = 1.77 μg

1 pmol pBR322 (4361 bp) = 2.88 μg

1 pmol M13mp18/19 DNA (7249 bp) = 4.78 μg

1 pmol λ DNA (48 502 bp) = 32.01 μg

C) 长度换算成质量

1 kb 双链 DNA(钠盐) = 6.6×10^5 Da

1 kb 单链 DNA(钠盐) = 3.3×10^5 Da

1 kb 单链 RNA(钠盐) = 3.4×10^5 Da

3) 蛋白质分子质量与摩尔的换算

100 pmol 分子质量 10 000 Da 蛋白质 = 1 μg

氨基酸平均分子质量 = 126.7 Da

4) 蛋白质与 DNA 的换算

1 kb DNA = 333 个氨基酸编码容量 = 37 000 Da 蛋白质

10 000 Da 蛋白质 = 270 bp DNA

4. 单字母表示法

1) 核苷酸

A = 腺苷酸	C = 胞苷酸	G = 鸟苷酸	T = 胸苷酸	U = 尿苷酸
B = C 或 G 或 T	D = A 或 G 或 T	H = A 或 C 或 T	K = G 或 T	
M = A 或 C	N = A 或 G 或 C 或 T	R = A 或 G	S = C 或 G	
V = A 或 C 或 G	W = A 或 T	Y = C 或 T		

2) 氨基酸

A = Ala	B = Asx (Asn 或 Asp)		C = Cys	D = Asp	E = Glu
F = Phe	G = Gly	H = His	I = Ile	L = Leu	M = Met
N = Asn	K = Lys	P = Pro	Q = Gln	R= Arg	S = Ser
T = Thr	W = Trp	Y = Tyr	V = Val	Z = Glx (Glu 或 Gln)	

5. 通用遗传密码表

第一碱基	第二碱基								第三碱基
	U		C		A		G		
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
	UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys	C
	UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	终止	UGA	终止	A
	UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	终止	UGG	Trp	G
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
	CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg	C
	CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg	A
	CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg	G
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U
	AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser	C
	AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg	A
	AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg	G
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U
	GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly	C
	GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly	A
	GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly	G

注：(1) AUG 和 GUG 也作起始密码子；

(2) UAA、UAG 及 UGA 为终止密码子。

附录三　各种识别位点的限制性内切核酸酶分类表

	****	A ** ** T	C ** ** G	**N**	A****T	C****G	G****C	T****A	A**N**T	C**N**G	G**N**C
AATT	TspE I				Apo I	Mun I	Apo I EcoR I				
ACGT	Mae II			Tsp4C I	Psp1406 I	BsaA I PmaC I	Aat II Hin1 I	BsaA I SnaB I			
AGCT	Alu I CviJ I				Hind III	NspB II Pvu II	Ban II Bsp1286 I HgiA I Sac I				
ATAT					Ssp I	Nde I	EcoR V				
CATG	Nla III				Afl III BspLU11 I Nsp I	Dsa I EcoT14 I Nco I	Nsp I Sph I	BspH I			
CCGG	Hap II Msp I	Mva I	Bcn I	ScrF I	Age I Bet I Cfr10 I	Ava I Sma I	Cfr10 I Nae I Tau I	Acc III Bet I Aor13H I			
CGCG	Acc II	Hpy99 I			Afl III Mlu I	Dsa I NspB II Sac II	BssH II Tau I	Nru I			
CTAG	Mae I Xsp I		BseM II	Dde I	Spe I	Bln I EcoT14 I	Nhe I	Xba I		Eco81 I	Bpu1102 I
GATC	Dpn I Mbo I Sau3A I	Tfi I		Hinf I	Bgl II Mfl I	Mcr I Pvu I	BamH I Mfl I	Fba I			
GCGC	Hha I	Tse I		Fnu4H I	Aor51H I Hae II		Bbe I BspT107 I Hae II HgiC I Hin1 I	Nsb I Avi II			
GGCC	CviJ I Hae III	Ava II VpaK11B I		Cfr13 I	Hae I Stu I	Eae I Eco52 I Mcr I	ApaI Ban II Bsp1286 I	Bal I Eae I Hae I	EcoO109 I		EcoO109 I
GTAC	Afa I		Tsp45 I	Mae III	Sca I Tat I	Spl I	BspT107 I HgiC I Kpn I	Bsp1407 I Tat I			BstP I EcoO65 I
TATA						Sfe I	Acc I Bst1107 I	Psi I			
TCGA	TthHB8 I				Cla I	Ava I Sml I Xho I	Acc I Hinc II Sal I	Nsp V BspT104 I			
TGCA	CviR I				EcoT22 I	Pst I Sfe I	ApaL I Bsp1286 I HgiA I				
TTAA	Mse I				PshB I	Afl II Sml I	Hinc II Hpa I	Dra I			

注：下画线标记：有多个识别序列的限制酶。

附录四　部分限制性内切核酸酶需要的保护碱基

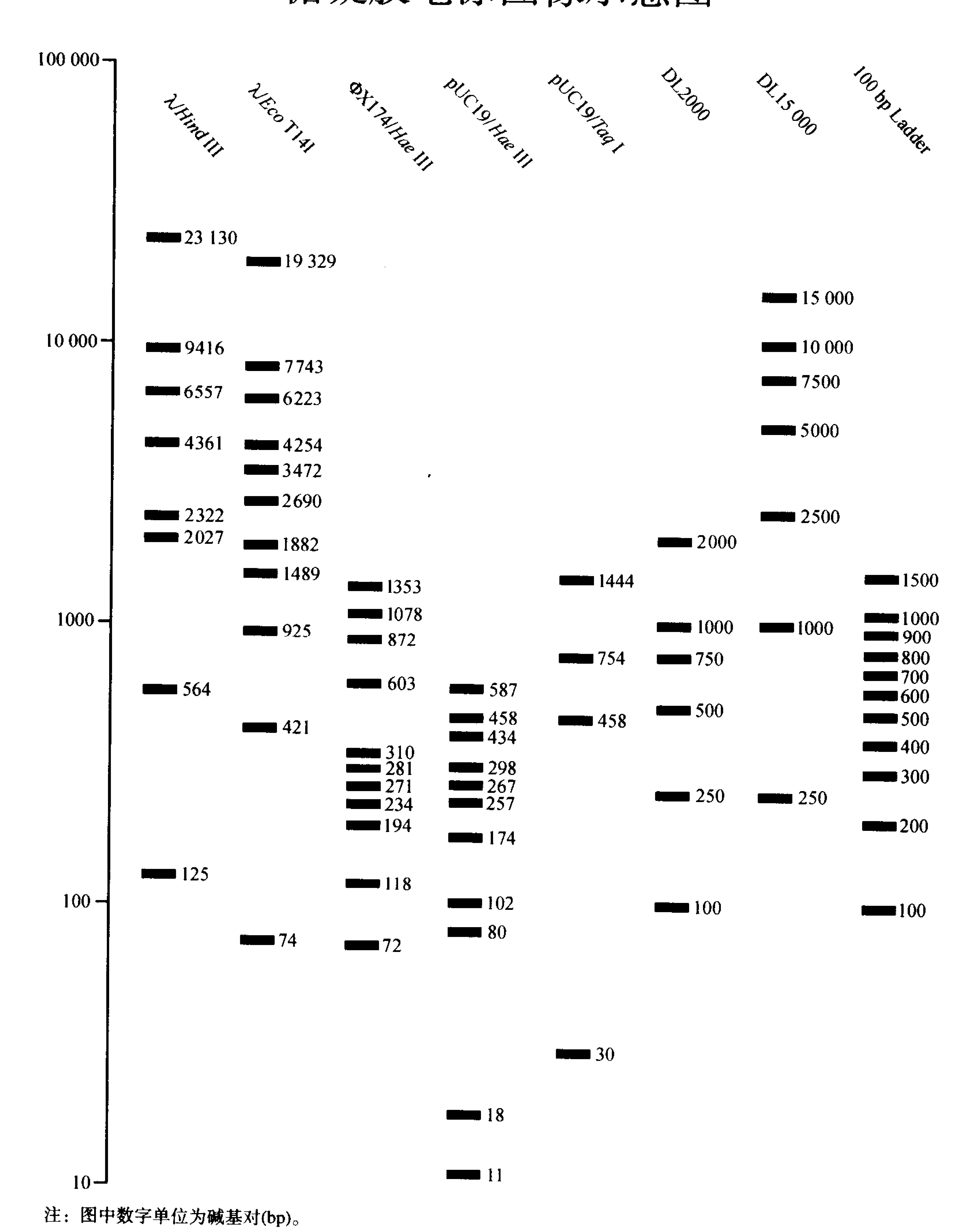
限制酶	碱基序列	链长/bp	切割% 2h	切割% 20h
Acc I	GGTCGACC	8	0	0
	CGGTCGACCG	10	0	0
	CCGGTCGACCGG	12	0	0
Afl III	CACATGTG	8	0	0
	CCACATGTGG	10	>90	>90
	CCCACATGTGGG	12	>90	>90
Asc I	GGCGCGCC	8	>90	>90
	AGGCGCGCCT	10	>90	>90
	TTGGCGCGCCAA	12	>90	>90
Ava I	CCCCGGGG	8	50	>90
	CCCCCGGGGG	10	>90	>90
	TCCCCCGGGGGA	12	>90	>90
*Bam*HI	CGGATCCG	8	10	25
	CGGGATCCCG	10	>90	>90
	CGCGGATCCGCG	12	>90	>90
Bgl II	CAGATCTG	8	0	0
	GAAGATCTTC	10	75	>90
	GGAAGATCTTCC	12	25	>90
*Bss*H II	GGCGCGCC	8	0	0
	AGGCGCGCCT	10	0	0
	TTGGCGCGCCAA	12	50	>90
*Bst*E II	GGGT(A/T)ACCC	9	0	10
*Bst*X I	AACTGCAGAACCAATGCATTGG	22	0	0
	AAAACTGCAGCCAATGCATTGGAA	24	25	50
	CTGCAGAACCAATGCATTGGATGCAT	27	25	>90
Cla I	CATCGATG	8	0	0
	GATCGATC	8	0	0
	CCATCGATGG	10	>90	>90
	CCCATCGATGGG	12	50	50
*Eco*R I	GGAATTCC	8	>90	>90
	CGGAATTCCG	10	>90	>90
	CCGGAATTCCGG	12	>90	>90
Hae III	GGGGCCCC	8	>90	>90
	AGCGGCCGCT	10	>90	>90
	TTGCGGCCGCAA	12	>90	>90
Hind III	CAAGCTTG	8	0	0
	CCAAGCTTGG	10	0	0
	CCCAAGCTTGGG	12	10	75
Kpn I	GGGTACCC	8	0	0
	GGGGTACCCC	10	>90	>90
	CGGGGTACCCCG	12	>90	>90
Mlu I	GACGCGTC	8	0	0
	CGACGCGTCG	10	25	50
Nco I	CCCATGGG	8	0	0
	CATGCCATGGCATG	14	50	75
Nde I	CCATATGG	8	0	0
	CCCATATGGG	10	0	0
	CGCCATATGGCG	12	0	0
	GGGTTTCATATGAAACCC	18	0	0
	GGAATTCCATATGGAATTCC	20	75	>90
	GGGAATTCCATATGGAATTCCC	22	75	>90
Nhe I	GGCTAGCC	8	0	0
	CGGCTAGCCG	10	10	25
	CTAGCTAGCTAG	12	10	50
Not I	TTGCGGCCGCAA	12	0	0
	ATTTGCGGCCGCTTTA	16	10	10
	AAATATGCGGCCGCTATAAA	20	10	10
	ATAAGAATGCGGCCGCTAAACTAT	24	25	90
	AAGGAAAAAAGCGGCCGCAAAAGGAAAA	28	25	>90
Nsi I	TGCATGCATGCA	12	10	>90
	CCAATGCATTGGTTCTGCAGTT	22	>90	>90
Pac I	TTAATTAA	8	0	0
	GTTAATTAAC	10	0	25
	CCTTAATTAAGG	12	0	>90
Pme I	GTTTAAAC	8	0	0
	GGTTTAAACC	10	0	25
	GGGTTTAAACCC	12	0	50
	AGCTTTGTTTAAACGGCGCGCCGG	24	75	>90
Pst I	GCTGCAGC	8	0	0
	TGCACTGCAGTGCA	14	10	10
	AACTGCAGAACCAATGCATTGG	22	>90	>90
	AAAACTGCAGCCAATGCATTGGAA	24	>90	>90
	CTGCAGAACCAATGCATTGGATGCAT	26	0	0
Pvu I	CCGATCGG	8	0	0
	ATCGATCGAT	10	10	25
	TCGCGATCGCGA	12	0	10
Sac I	CGAGCTCG	8	10	10
Sac II	GCCGCGGC	8	0	0
	TCCCCGCGGGGA	12	50	>90
Sal I	GTCGACGTCAAAAGGCCATAGCGGCCGC	28	0	0
	GCGTCGACGTCTTGGCCATAGCGGCCGCGG	30	10	50
	ACGCGTCGACGTCGGCCATAGCGGCCGCGGAA	32	10	75
Sca I	GAGTACTC	8	10	25
	AAAAGTACTTTT	12	75	75
Sma I	CCCGGG	6	0	10
	CCCCGGGG	8	0	10
	CCCCCGGGGG	10	10	50
	TCCCCCGGGGGA	12	>90	>90
Spe I	GACTAGTC	8	10	>90
	GGACTAGTCC	10	10	>90
	CGGACTAGTCCG	12	0	50
	CTAGACTAGTCTAG	14	0	50
Sph I	GGCATGCC	8	0	0
	CATGCATGCATG	12	0	25
	ACATGCATGCATGT	14	10	50
Stu I	AAGGCCTT	8	>90	>90
	GAAGGCCTTC	10	>90	>90
	AAAAGGCCTTTT	12	>90	>90
Xba I	CTCTAGAG	8	0	0
	GCTCTAGAGC	10	>90	>90
	TGCTCTAGAGCA	12	75	>90
	CTAGTCTAGACTAG	14	75	>90
Xho I	CCTCGAGG	8	0	0
	CCCTCGAGGG	10	10	25
	CCGCTCGAGCGG	12	10	75
Xma I	CCCCGGGG	8	0	0
	CCCCCGGGGG	10	25	75
	CCCCCCGGGGGG	12	50	>90
	TCCCCCCGGGGGGA	14	>90	>90

附录五　筛选重组子用的平板标签贴纸(Φ = 9cm)

					1	2					
			3	4	5	6	7	8			
		9	10	11	12	13	14	15	16		
	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	
37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	
	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	
		81	82	83	84	85	86	87	88		
			89	90	91	92	93	94			
					95	96					

		1	2		
	3	4	5	6	
7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18
	19	20	21	22	
		23	24		

附录六　常用DNA相对分子质量标准物的琼脂糖凝胶电泳图像示意图



注：图中数字单位为碱基对(bp)。

附录七　本书作为教材的使用方法

“分子生物学实验”正陆续列入各高校的教学计划，但有些高校的教学效果不尽如人意，仅仅提质粒，做电泳，学生不满意，教师也头疼。导致这种状况的原因可能有：①分子生物学技术面广，新技术层出不穷，在教学内容的选择上出现了问题；②开设分子生物学实验所需经费比其他实验课的多，在教学经费上碰到了问题；③适合教学用的目的基因较少，有些高校得不到任何目的基因，有些高校选择的目的基因在检测或表达酶分析上遇到了不适合教学的问题。因此，如何开设出培养学生创新能力的“分子生物学实验”课程体系，是高校教师义不容辞的责任，为此我们在这方面进行了探索，提出了有效解决上述问题的课程体系，该体系具有如下特点：

(1) 根据不同教学对象选择难易不同的课程体系，教学经费人均在 50~120 元(以 100 名学生人数为计算基准)。

(2) 整个课程体系就是 1~2 个综合实验，每次实验都是从综合实验分解而来，内容涉及质粒 DNA 提取、基因克隆、表达、调控、活性酶提取及活力测定、多态性分析等全过程，涵盖了许多实用的分子生物学基本操作技术，可以培养学生的创新能力。

(3) 选用的目的基因小(可读框仅 666 bp)，广泛存在于动植物细胞中，酶活力检测方便、灵敏、费用低(如果选用该目的基因作为教学材料，我们可以免费提供相关基因、载体及菌株)。

(4) 可以围绕实验结果对学生进行考核，标准如下：A. 实验预习(15%)：预习报告的字迹是否清晰、原理是否简明、步骤是否明了、重点和疑点是否突出、能否积极回答教师的提问及回答的准确性。B. 实验操作(35%)：操作是否合理、规范和熟练，实验结果是否正确及对结果是否有合理的分析。C. 实验态度(10%)：实验过程是否认真、观察是否仔细、实验结果是否实事求是。D. 实验报告(20%)：实验原理的理解、结果的讨论上是否有深度，实验报告的写作是否规范，字迹是否清晰。E. 思考题(10%)：是否根据实验结果做出正确的回答，回答是否有新意。F. 平时表现(10%)：是否迟到、早退，遵守课堂纪律，考核个人的实验卫生和公共环境卫生，是否有团结协作精神和对公益劳动的态度。

下面是我们建立的课程体系及目的基因的相关信息，供参考。

1. 培养学生创新能力的“分子生物学实验”课程体系

1) 面向专科生(2 学分，人均经费 50 元)

实验一、实验室安全教育与常用仪器介绍

目的：了解分子生物学实验室的规则与安全，了解常用仪器(如微量移液器、离心机、纯水器)的使用方法(第一章和第二章)。

实验二、DNA 数据库介绍及同源比对

目的：了解国际上 3 大主要 DNA 数据库的构成，对目的基因(如 *AtGSTZ*)进行同源比对分析(第十八章)。

实验三、LB 培养基的配制及大肠杆菌的培养

目的：了解培养基的组成，配制 LB 培养基，并接种大肠杆菌(如 DH5α)进行培养(第三章)。

实验四、质粒 pMID I-AtGSTZ 的小量提取及琼脂糖凝胶电泳分析

目的：了解质粒小量提取的方法和琼脂糖凝胶电泳的原理与方法，提取含目的基因的质粒并进行电泳检测(第五章和第七章)。

实验五、以质粒 pMID I-AtGSTZ 为模板的 PCR 扩增及电泳检测

目的：了解 PCR 扩增的原理和引物设计的要点，以含目的基因的质粒进行 PCR 扩增，并对扩增产物进行电泳检测与定量(第五章和第十一章)。

实验六、$CaCl_2$ 法感受态细胞的制备及质粒 pMID I-AtGSTZ 转化 DH5α

目的：了解 $CaCl_2$ 法感受态细胞的制备原理与方法，用 $CaCl_2$ 法将含目的基因的质粒转化进大肠杆菌(第八章)。

实验七、菌落 PCR 法筛选重组子

目的：了解菌落 PCR 法筛选重组子的原理与方法，获得重组转化子(第十五章)。

实验八、重组质粒 pMID I-AtGSTZ 酶切鉴定

目的：了解限制性内切核酸酶的作用原理，酶切操作基本步骤，并对酶切片段进行电泳检测(第四章和第五章)。

2) 面向本科生(2 学分，人均经费 80 元)

实验一、质粒 pMID I-AtGSTZ 的小量提取与琼脂糖凝胶电泳检测(第五章和第七章)

目的：了解质粒小量制备的方法和琼脂糖凝胶电泳的原理与方法，提取含目的基因的质粒并进行电泳检测。

实验二、表达载体[pET21b(+)]的大量制备、酶切及脱磷酸化处理

目的：了解表达载体的结构组成、限制性内切核酸酶切及脱磷酸化原理与方法，对酶切产物进行电泳检测并定量(第四章和第七章)。

实验三、以质粒 pMID I-AtGSTZ 为模板的 PCR 扩增、酶切及电泳回收

目的：了解 PCR 扩增的原理，引物设计要点，以含目的基因质粒进行 PCR 扩增，用电泳法回收目的片段(第四章和第十一章)。

实验四、改良 Hanahan 法感受态细胞的制备及转化率测定

目的：了解改良 Hanahan 法感受态细胞的制备原理与方法，并测定其转化率(第八章)。

实验五、基因 *AtGSTZ* 酶切片段与载体[pET21b(+)] DNA 酶切片段的连接及连接子的转化

目的：了解 DNA 连接酶原理与方法，将目的基因与载体相连接，将连接子转化进大肠杆菌(第四章和第八章)。

实验六、菌落 PCR 法与酶切法筛选重组子[pET21b(+)-AtGSTZ]

目的：了解菌落 PCR 法与酶切法筛选重组子的原理与方法，获得重组转化子(第十

五章)。

实验七、基因 *AtGSTZ* 在大肠杆菌中的表达与目的蛋白的 SDS-PAGE 检测

目的：了解目的基因在大肠杆菌中表达及 SDS-PAGE 的原理与方法(第五章和第二十六章)。

实验八、表达 AtGSTZ 酶的提取及比活力分析

目的：了解表达酶提取方法及酶比活力分析原理与方法(第二十六章)

3) 面向硕士生(2 学分，人均经费 150 元)

实验一、动(植)物基因组 DNA 的制备与纯化

目的：了解动(植)物基因组 DNA 制备与纯化的原理与方法(第十章)。

实验二、动(植)物基因组 DNA 的 RAPD 分析

目的：了解 RAPD 分析原理，并对结果进行分析(第十七章)。

实验三、动(植)物基因组 DNA 的微卫星标记分析

目的：了解微卫星标记分析原理，并对结果进行分析(第十七章)。

实验四、探针制备与 Southern 印迹

目的：了解探针制备与 Southern 印迹的原理与方法(第十三章和第十六章)。

实验五、动(植)物总 RNA 提取与变性电泳检测

目的：了解从动(植)物组织中提取 RNA 的原理与方法，及变性凝胶电泳检测的原理与方法(第十九章)。

实验六、RT-PCR 法分离 *AtGSTZ* 基因

目的：了解 RT-PCR 分离目的基因的原理与方法，并获得目的基因(第二十二章)。

实验七、基因 *AtGSTZ* 重组入毕赤酵母表达载体 pPIC9K

目的：了解目的基因重组入毕赤酵母表达载体的原理与方法(第三十章)。

实验八、基因 *AtGSTZ* 在毕赤酵母表达系统中的表达及活力分析

目的：了解目的基因在毕赤酵母表达系统中表达的原理，并对表达酶进行活力测定(第三十章)。

2. 与上述课程体系相关的基因、载体及表达酶的信息

1) 酶的信息

谷胱甘肽 S-转移酶(GST，EC. 2.5.1.18)是一个超家族酶系，存在于所有的真核生物细胞中。基于 GST 氨基酸序列相似性，植物 GST 酶系分属如下 4 类：Phi、Zeta、Tau 和 Theta。

Zeta 类(简写为 GSTZ)的酶学特性研究显示 GSTZ 是一个多功能酶，综合起来有以下几个方面：

(1) GSTZ 对二氯乙酸(dichloroacetic acid，DCA)及 DCA 的类似卤代物有较强的脱卤活性。DCA 及类似氯代物是自来水氯处理过程中产生的对啮齿动物具有极强致癌特性的公共污染物。

(2) 具有顺丁烯二酰乙酰乙酸异构酶(MAAI，E.C. 5.2.1.2)活性。MAAI 是生物体内的苯丙氨酸、酪氨酸代谢的关键酶，催化顺丁烯二酰乙酰乙酸盐异构为延胡索酰乙酰乙酸盐。

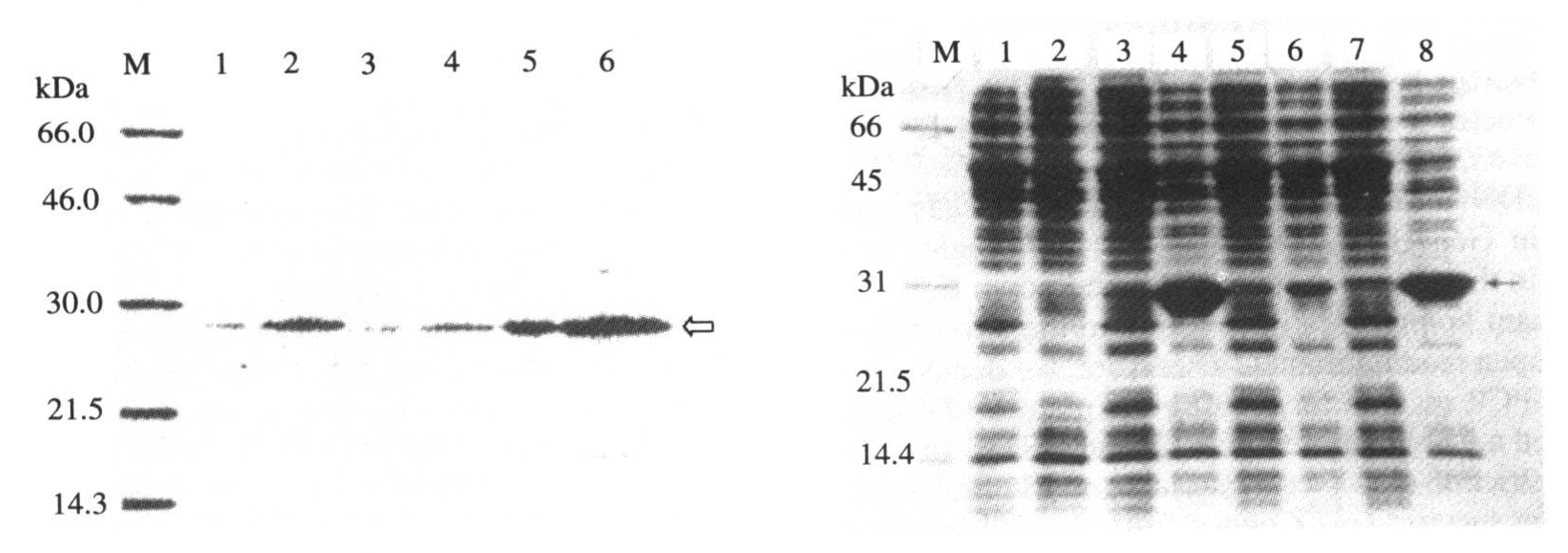
2) 基因信息

拟南芥来源 *GSTZ* 基因序列见 GenBank (注册号 AY208155)，其可读框长度为 666 bp，%(G + C) = 43.84，序列为：

atggcgaattccggcgaagagaagttgaagctctactcttactggagaagctcgtgtgctcatcgtgtccgtatcgccctcgctttga
aagggcttgattatgagtatataccagtgaatttgctcaagggtgatcaattcgattcagatttcaagaagatcaatccaatgggaac
tgtaccagctctggtggatggagatgttgtgattaatgattcttttgcgataataatgtatctggatgagaagtaccctgagccacct
ttgttacctcgtgacctccataaacgagctgtgaattaccaggcaatgagtattgtcttgtctggcatacagcctcatcaaaatctgg
ctgttattaggtatatcgaggaaaagataaatgtggaggagaagactgcctgggttaataatgctatcacaaaaggatttacagctct
cgagaaactgttggtgaattgcgctgggaaacatgcgactggtgatgaaatttacctggctgatctctttctagcaccacagatccac
ggagcaatcaacagattccagattaacatggaaccgtacccaactcttgcaaaatgttacgaatcatacaacgaactgcctgcgtttc
aaaatgcactaccggaaaagcagccagatgctccttcttccaccatctga

编码的蛋白质大小为 221 个氨基酸，分子质量为 24 887.61 Da(附图 1 和附图 2)，序列为：

MANSGEEKLKLYSYWRSSCAHRVRIALALKGLDYEYIPVNLLKGDQFDSDFKKINPMGTVPALVDGDVVINDSFAIIMYLDEKYPEPP
LLPRDLHKRAVNYQAMSIVLSGIQPHQNLAVIRYIEEKINVEEKTAWVNNAITKGFTALEKLLVNCAGKHATGDEIYLADLFLAPQIH
GAINRFQINMEPYPTLAKCYESYNELPAFQNALPEKQPDAPSSTI



附图 1 小麦胚芽无细胞蛋白质合成系统(左)和大肠杆菌表达系统(右)所表达的植物 GSTZ 的 SDS-PAGE 图谱[Chen *et al*. J Biosci Bioeng, 2003, 95(6): 594~600]



附图 2 拟南芥谷胱甘肽 S-转移酶 Zeta 类的 3D 结构

[Thom *et al*. J Mol Biol, 2001, 308(5): 949~962]

3) 载体信息

质粒 pMID I-AtGSTZ 全序列：

CCatggcgaattccggcgaagagaagttgaagctctactcttactggagaagctcgtgtgctcatcgtgtccgtatcgccctcgcttt
gaaagggcttgattatgagtatataccagtgaatttgctcaagggtgatcaattcgattcagatttcaagaagatcaatccaatggga
actgtaccagctctggtggatggagatgttgtgattaatgattcttttgcgataataatgtatctggatgagaagtaccctgagccac
ctttgttacctcgtgacctccataaacgagctgtgaattaccaggcaatgagtattgtcttgtctggcatacagcctcatcaaaatct
ggctgttattaggtatatcgaggaaaagataaatgtggaggagaagactgcctgggttaataatgctatcacaaaaggatttacagct
ctcgagaaactgttggtgaattgcgctgggaaacatgcgactggtgatgaaatttacctggctgatctctttctagcaccacagatcc
acggagcaatcaacagattccagattaacatggaaccgtacccaactcttgcaaaatgttacgaatcatacaacgaactgcctgcgtt
tcaaaatgcactaccggaaaagcagccagatgctccttcttccaccatcggcggccgcCATCATCATCATCATCACTAGCATAACCCC
TTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAACTATATCCGGATCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACC
GATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTA
CGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTT
TCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGAGCTTTACGGCACCTCGACCGCAAAAAACTTGATTTGGGT

GATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGT
TCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCGCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAA
TGAGCTGATTTAACAAATATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCA
TCTGTGCGGTATTTCACACCGCATACAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATT
CAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCG
TGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGAT
CAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAA
TGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGATACACTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCCCCCGCGGTA
TTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCC
ATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGG
GGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGAGTGACACCACGATGCCTGTAGC
AATGCCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGAATGGAGGCGGAT
AAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCG
GTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCGCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACG
AAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGAT
TTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGT
TCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAA
AAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAG
ATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAA
TCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCG
GTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGA
GAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTC
CAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGG
GCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGGCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCG
TTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGT
CAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGATCTCGATCCCG
CGAAATTAATACGACTCACTATAGGGCGAAACGAATCTCAAGCAATCAAGCATTCTACTTCTGG

4) 目的基因扩增体系

PCR 反应体系如下：

引物 A(10 mmol/L)	1.25 μL
引物 B(10 mmol/L)	1.25 μL
Taq 添加缓冲液	10 μL
DNA 模板(0.5 ng/μL)	2 μL
dNTP	8 μL
Taq DNA 聚合酶	0.5 μL
加双蒸水至	100 μL

PCR:　94℃ 5 min
94℃ 40 s ┐
58℃ 32 s　35 循环
72℃ 90 s ┘
72℃ 7 min
4℃ ∞

引物 A 序列：5'-CTACTTCTGCATATGGCGAATTCCGGC，下画线为 *Nde* I 酶切位点

引物 B 序列：5'-GATGATGATGGCGGCCGCGATGGTGGA，下画线为 *Not* I 酶切位点

5) GSTZ 酶活性测定

如果重组子中含有 GSTZ 基因，通过表达，将在大肠杆菌系统或其他表达系统中将表达出 GSTZ 酶。酶的活性可通过 DCA 脱氯反应来测定。由于 DCA 脱氯反应最终产生乙醛酸，因此酶表达量和活性可以通过乙醛酸含量的变化来定量。由于乙醛酸与盐酸苯肼反应可产生铁氰化钾发色的苯肼物，该物质在 535 nm 下有最大吸收峰，因此通过测定 A_{535} 值可知乙醛酸的含量。

Materials

(1) 100 mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.4)

0.2 mol/L NaH_2PO_4 或 KH_2PO_4	19 mL
0.2 mol/L Na_2HPO_4 或 K_2HPO_4	81 mL
双蒸水	100 mL

(2) 0.8 mol/L 磷酸缓冲液(pH6.8)

1 mol/L NaH_2PO_4 或 KH_2PO_4	51 mL
1 mol/L Na_2HPO_4 或 K_2HPO_4	49 mL
双蒸水	25 mL

(3) 10 mmol/L DCA(二氯乙酸)
配制在 100 mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.4)

(4) 10 mmol/L GSH(谷胱苷肽)
配制在 100 mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.4)

(5) 盐酸苯肼(phenylhydrazine hydrochloride，PHC)溶液
100 mg 溶于 15 mL 双蒸水。当日配制，配制后预冷到 4℃

(6) 铁氰化钾溶液
500 mg 溶于 15 mL 双蒸水。现用现配，配制后预冷到 4℃，配后 3 h 内使用

Protocols　　Times：2.5 h

ⓐ 准备酶液：酶液+0.5 mmol/L DCA+1 mmol/L GSH，用 100 mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.4)补齐至 200 μL (DCA 最后加，加后立即计时)。

↓

ⓑ 37℃培养 40 min。

↓

ⓒ 加 10 μL 三氟醋酸终止反应，冰浴 10 min。

↓

ⓓ 15 000 r/min 离心 5 min 去除沉淀。

↓

ⓔ 上清(180 μL)转至新管，加 100 μL 1 mol/L NaOH 中和。

↓

ⓕ 加 60 μL 0.8 mol/L 磷酸缓冲液(pH6.8)和 85 μL PHC 溶液，混合均匀。

↓

ⓖ 室温放置 10 min 后冰浴 10 min。

↓

ⓗ 加预冷浓 HCl (210 μL)和 85 μL 铁氰化钾溶液，混匀。

↓

ⓘ 室温精确计时 15 min，测 A_{535} 值。

↓

ⓙ 用乙醛酸做标准曲线，通过标准曲线计算乙醛酸生成量，进而计算酶活性。